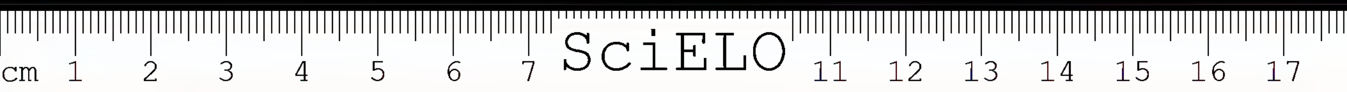
MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1944-1945

TOMO XVIII



São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65




cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1944 - 1945

TOMO XVIII



São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

Toda a correspondência relativa às Memórias deve ser dirigida ao

Editor, MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

Caixa Postal, 65

São Paulo, Brasil.

ÍNDICE

PORTADORES DO BACILO DE LOEFFLER ENTRE OS ESCOLARES DE SÃO PAULO

POR

JANDYRA P. DO AMARAL & MARIA CAROLINA DE ANDRADE

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

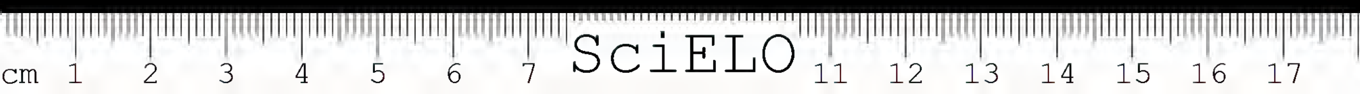
Um ponto de extrema importância no estudo da epidemiologia da difteria é o de saber se numa população tornada 100% Schick-negativa, seja pela imunização natural, seja pela vacinação profilática, o desaparecimento da difteria clínica está associado a uma redução correspondente da porcentagem de portadores sãos do bacilo de LOEFFLER. DUDLEY (1), em 1934, sugeriu mesmo que a vacinação contra a difteria pudesse aumentar o número de portadores sãos de bacilos diftéricos virulentos. Fôra verdadeiro êsse fato e a imunização dos escolares poderia redundar num perigo para as creanças em idade pre-escolar.

Felizmente, porém, a sugestão de DUDLEY não encontra apôio nos dados estatísticos acumulados sôbre o argumento. Assim, DEADMAN (2) refere que em HAMILTON, ONTARIO, enquanto que em 1920, de 8261 culturas feitas em seu laboratório, resultaram 1040 positivas para o bacilo de LOEFFLER, havendo cifra igualmente elevada de resultados positivos em 1921 (1234 em 9645), depois do início da vacinação, em 1932, de 3929 culturas examinadas apenas 85 mostraram bacilos diftéricos. Em 1934 e 1936, não se encontrou um único caso de portador de bacilo de LOEFFLER em 3817 e 3949 culturas respectivamente.

Igualmente convincentes são as estatísticas feitas em Toronto, em 1934-1936 (4 culturas de bacilos diftéricos virulentos em 7800 exames de material de nariz e de garganta) e em Montreal (1935-1937) onde se evidenciaram apenas 2 portadores de bacilo de Loeffler num total de 1774 escolares examinados.

Em São Paulo, a vacinação antidiftérica sistemática e em escala considerável foi iniciada em 1940 pelo Dr. H. SAMPAIO CORREA, diretor da Seção de Epidemiologia do Departamento de Saúde. Este serviço conseguiu vacinar com três doses de anatoxina simples (0.5-1.0 e 1.5 ml) um total de 108.952 escolares de São Paulo, sendo que 9891 creanças receberam vacinação incompleta (3).

Pareceu-nos de interêsse proceder a uma verificação do indice de portadores entre os escolares de São Paulo, comparando dois lotes-vacinado e não vacinado,



tanto mais quanto eram escassas as estatísticas de portadores de bacilos diftéricos, entre nós, destacando-se apenas a tese de doutoramento de CASTRO SIMÕES (4), em 1921, a qual registra a percentagem de 3, 7% num total de 1054 indivíduos de todas as idades examinados em São Paulo. Além dêsse trabalho, temos conhecimento apenas do estudo feito por MONTEIRO FILHO (5), em 1937, no Rio de Janeiro, que, examinando 548 escolares no bairro de Tijuca naquela cidade, encontrou 3% de portadores de bacilos diftéricos virulentos e 1% de avirulentos.

As nossas verificações foram feitas em 1943-1944, abrangendo um total de 3071 creanças, pertencentes a 5 grupos escolares denominados Butantan, Alfredo Bresser, Pinheiros, Vila Madalena e São Paulo, o primeiro no bairro de Butantan, os dois seguintes no bairro de Pinheiros e os dois últimos respectivamente nos bairros de Vila Madalena e Consolação.

MATERIAL E MÉTODOS

Com estilete apropriado foi colhido separadamente o material do nariz e da garganta de cada creança, o qual levado logo ao laboratório foi semeado em meio de Loeffler. Após 18 horas de incubação a 37.° foram feitos esfregaços que, corados pelos métodos de Neisser e Gram, foram cuidadosamente examinados ao microscópio para seleção das culturas morfològicamente suspeitas.

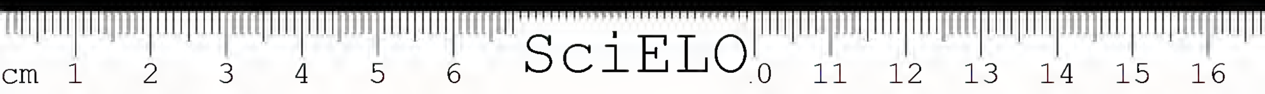
O isolamento dessas foi feito em placas de agar-sôro-telurato (técnica adotada no Instituto A. Lutz) e em meio de Mc Leod. As colônias suspeitas foram selecionadas, cultivadas em meio de LOEFFLER e as culturas de 24 horas consideradas puras foram objeto das verificações seguintes:

i) *Fermentação de carbohidratos*: dextrose, maltose, sacarose, dextrina, amido e glicogênio, incorporados na proporção de 1% (com exceção do glicogênio, que se usou a 0.5%) em sôro-água de HISS com indicador ANDRADE.

ii) *Poder hemolítico*: verificado com glóbulos vermelhos de coelho, segundo a técnica de HAMMERSCHMID, tal como é indicada por SCHIFF & WERBER (6).

iii) *Test de virulência*: pela prova intradérmica em cobaia, segundo W. MAIR (7).

iv) *Poder toxígeno*: verificado em culturas feitas em caldo MARTIN — meio clássico para a produção da toxina diftérica, em presença de quantidades variáveis de ferro e tendo-se sempre o cuidado de experimentar por comparação com a raça toxígena PARK 8. Aferição das toxinas em d.m.r., pelo método intracutâneo, em coelhos.



RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A tabela 1 mostra o número de creanças examinadas em cada Grupo Escolar separadamente e a percentagem de portadores de bacilo de LOEFFLER.

TABELA 1

Portadores de bacilos de Loeffler em alguns Grupos Escolares da Capital

Grupo Escolar	Nº. de creanças examinadas	% de vacinados	% de portadores	
			no lote vacinado (1072 creanças)	no lote não vacinado (1870 creanças)
Butantan	506	33.8	0	2.03
Alfredo Bresser ..	865	45.3	1.53	3.28
Pinheiros	215	26.5	0	2.56
Vila Madalena ...	567	55.4	2.22	4.38
São Paulo	918	15.03	1.44	1.09
Totais	3071	34.9	1.39	2.3

Diferença das % de portadores nos lotes vacinado e não vacinado: 0.91
Desvio standard da diferença: 0.355 — Chi-quadrado: 2.74

A porcentagem total de portadores verificada foi de 1.88 (58 em 3071), inferior portanto à registrada por CASTRO SIMÕES, em 1921 (3,7%).

Poder-se-ia pensar que tal diferença fosse imputável à vacinação, embora no largo espaço de vinte e dois anos que separam as duas investigações (de 1921 a 1943) muitos outros fatores epidemiológicos possam ter atuado, de modo a modificar completamente as proporções observadas.

Comparando-se os lotes vacinados e não vacinados, chega-se, porém, à conclusão de que não há diferenças significativas entre as porcentagens observadas, pois, embora a diferença registrada (0.91) seja igual a 2,5 vêzes o desvio standard dessa diferença, o valor chi-quadrado correspondente às porcentagens observadas atinge apenas a 2,74, equivalente a uma probabilidade de 0,1.

Aproveitando ainda as fichas organizadas para cada creança particularmente, pudemos elaborar as tabelas 2 e 3, que indicam as percentagens de portadores em relação à côr e ao sexo.

TABELA 2

Portadores de bacilos de Loeffler em relação à côr

Côr	No. de creanças examinadas	Portadores	
		Número	Percentagem
Brancos	2.531	47	2,85
Amarelos	145	5	3,44
Pardos	152	1	0,65
Pretos	183	5	2,73
Inf. falha	60	0	—
Total	3.071	58	1,88

TABELA 3

Portadores de bacilos de Loeffler em relação ao sexo

Sexo	No. de creanças examinadas	Portadores	
		Número	Percentagem
Masculino	1.525	31	2,03
Feminino	1.546	27	1,74
Total	3.071	58	1.88

Pela inspeção da tabela 3 notamos uma percentagem mais alta de portadores nos amarelos (3,44) seguindo-se imediatamente as creanças de côr preta com (2,73%), os brancos (1,85%) e, por fim, os pardos (0,65).

Em relação ao sexo a diferença de percentagem observada foi de 0.29 apenas (2,03% para os meninos e 1,75% para as meninas).

Em última etapa foram estudadas as características das 58 amostras isoladas, as quais figuram resumidamente na tabela 4.

Devemos ressaltar desde logo que encontramos uma única amostra virulenta, o que se fosse computado para a seleção dos portadores, como querem alguns epidemiologistas, viria reduzir a nossa percentagem de 1,88 para 0.32.

Com relação à capacidade de produzir toxina, encontramos 9 raças que mostraram, quando injetadas na pele do coelho, em comparação com uma to-

xina standard, d.m.r. correspondente a 0,2 ml das seguintes diluições: 1/200 — 1; 1/20.000 — 2; 1/40.000 — 1; 1/60.000 — 1 e 1/100.000 — 4.

Precedendo à classificação dos tipos segundo um esquema clássico de ANDERSON & col., encontramos 8 amostras pertencentes ao tipo *gravis*, 17 ao *mitis*, 34 ao *intermedius* e uma amostra atípica.

É talvez digno de menção o fato que a única amostra virulenta encontrada se classifique como intermediária.

RESUMO

1. Foram examinadas 3.071 creanças de alguns grupos escolares da capital de S. Paulo, a fim de determinar-se a incidência de portadores de bacilos diftéricos no nariz ou na garganta, encontrando-se um total de 58 culturas positivas, o que dá uma porcentagem de 1,88%.

2. Pela separação dêsses escolares em 2 lotes — vacinado (3 doses de anatoxina simples) e não vacinado, não se logrou verificar uma diferença significativa das percentagens observadas (respectivamente, 1.39 e 2.3).

3. Das amostras isoladas, 1 única (aliás, isolada de creança vacinada) se mostrou virulenta e apenas 9 se revelaram toxígenas.

4. A incidência dos diferentes "tipos" foi a seguinte:
mitis — 15; *intermedius* — 34; *gravis* — 8. além de 1 raça atípica, cujo tipo não poude ser determinado.

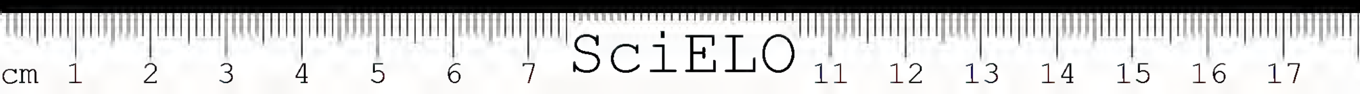
ABSTRACT

1. 3.071 children from several public schools of the city of São Paulo were examined, in order to investigate the occurrence of carriers of diphtheric bacilli in nose or throat, and 58 positive cultures were found, this is, a rate of 1.88 per cent.

2. These children were separated in two lots: vaccinated (3 doses of simples anatoxin) and not vaccinated children, however it was not possible to detect a significant difference between the observed rates (1.39 and 2.3 per cent, respectively).

3. Of the 58 isolated samples, only one (isolated from a vaccinated child) proved virulent and only 9 proved toxigenic.

4. The incidence of the different types was the following:
mitis — 15; *intermedius* — 34; *gravis* — 8, besides one atypical race, the type of which could not be determined.



BIBLIOGRAFIA

1. *Dudley, P. M. & O'Flynn, J. A.*, Sp. Med. Council, London, n.º 195.
2. *Deadman, W. J. & Elliot, F. J.* (1933). *Canad. J. Pub. Health*, **24**, 137.
3. Informação pessoal.
4. *Simões, João Castro* (1921). *Tese Doutoramento da Fac. Med. de S. Paulo.*
5. *Monteiro Filho, A.* (1937). Investigações sôbre portadores do bacilo diftérico no Rio de Janeiro. *Arq. de Hig.*, 1-2, 371-377.
6. *Schiff & Werber* (1935). *Deutsche med. Wchnschr.*, **61**, 259.
7. *W. Mair* (1930). On testing *C. Diphtheriae* for virulence by the intracutaneous method. *J. Path. & Bact.*, **33**, 230-231.

(Recebido para publicação em março de 1945).

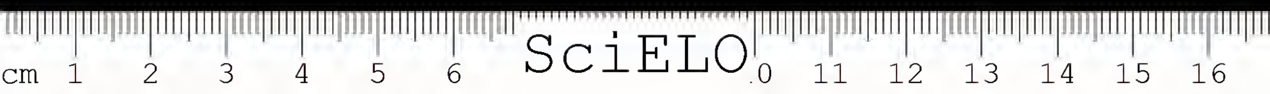


Tabela 4

		CARACTERISTICAS DE ESPECIE								CARACTERISTICAS DE TIPO				
G.1032	Ge[illegible]	Tipicos mal corados	+	+	—	—	—	—		Turvação uniforme	Lisa preta	"	'	......
G.2236	Tipicos Médios	Raros elementos com granulações	+	+	—	+	—	—	—	Turvação Depósito	Centro saliente Bordos irregulares	—	—	"
G.2297	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	--	—	Pelicula Transparente Depósito	Centro saliente Bordos irregulares pequenos	—	—	"
G.2298	Tipicos Médios	Mal corados Granulações pequenas	+	+	—	+	—	—	+	Turvação uniforme Depósito	Lisas pretas Periferia mais clara	—	—	"
G.2434	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	--	--	—	Turvação uniforme Depósito	Lisas pretas brilhantes	—	= $^1/_{300}$	"
G.2556	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Turvação uniforme	Cinza Periferia mais clara	—	—	"
G.2632	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	--	Pelicula. Turvação. Depósito	Lisas pretas brilhantes	—	—	"
G.2815	Tipicos Curtos	Raras granulações e pequenas	+	+	—	+	—	—	+	Transparente Ligeiro depósito	Lisas pretas brilhantes Crescimento tardio e escuro	—	—	"
G.3001	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	+	+	--	Pelicula Transparente Depósito	Cinza opaca Bordos irregulares	—	—	Gravis
G.3028	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	+	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta brilhante	—	—	Intermedios
	Mitis	17		Gravis		8			Interm. 31			Atípicos 1		

TABELA 4

N.º	CARACTERISTICAS DE ESPÉCIE									CARACTERISTICAS DE TIPO		Virulencia	Toxigenicidade	Tipo
	Morfologia													
	Gram	Neisser	Dextrose	Maltose	Sacarose	Dextriva	Amido	Glicogenio	Hemólise	Aspecto em caldo	Colonia Mc. Leod			
G. 46	Tipicos	Mal corados Disposições caracteristicas. Sem granulações.	+	N. v.	—	+	N. v.	N. v.	N. v.	N. v.	Lisa. Cinza, Periferia transparente	N. v.	N. v.	
G. 261	Tipicos Médios	Mal corados Raros elementos com granulações.	+	+	—	+	—	—	—	Turvação uniforme	Lisa. Preta brilhante	—	N. v.	Intermedios
G. 394	Tipicos Longos	Bem corados com granulações bem marcadas.	+	+	—	+	+	+	—	Mais ou menos claro. Depósito	Cinza Periferia transparente	—	N. v.	Gravis
G. 408	Tipicos Médios	Mal corados Poucos elementos com granulações.	+	+	—	+	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa. Escura	—	N. v.	Mitis
G. 457	Tipicos Longos	Mal corados Poucos elementos com granulações.	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito	Crespa. Escura e sem brilho	—	N. v.	Gravis
G. 501	Tipicos Médios	Mal corados Poucos elementos com granulações.	+	+	—	+	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa. Escura	—	N. v.	Mitis
G. 575	Tipicos Tamanho irregular	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa preta	—	—	"
N. 548	Tipicos Longos	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	+	—	—	++	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta	—	—	"
G.	Tipicos Longos	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	+	—	—	++	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta	—	—	"
G. 565	Tipicos Médios	Mal corados Raros elementos com granulações.	+	+	—	—	—	—	++	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta	—	—	"
N. 719	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta	—	—	"
G. 726	Todo o corpo dos bacilos Gram+ Curtos	Disposição um tanto regular	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme	Crescimento tardio Cultura escassa Microscópicas	—	—	Intermedios
G. 729	Tipicos Médios	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	—	—	—	++	Pelicula Turvação Depósito	Crescimento tardio Cultura escassa Microscópicas	—	—	Mitis
G. 768	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Mais ou menos transparente Depósito	Lisa cinza	—	= 1/100	Intermedios
N. 854	Tipicos Tamanho muito irregular	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Transparente Depósito granular	Crescimento tardio Mais ou menos crespas	—	—	"
G. 875	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	+	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta	—	—	"
G. 928	Morfologia muito variada:	Mal corados Não se veem granulações	+	+	—	+	—	—	++	Transparente Ligeiro depósito	Cultura escassa. Lisa. Preta brilhante	—	—	Mitis
N. 937	Bac. uniformemente Gr.+ Curtos	Mal corados e pouco perceptiveis nessa coloração.	+	+	—	—	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa preta	—	= 1/200	"
G.	Bacilos muito finos Médios	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa preta	—	= 1/200	"
G. 941	Formas irregulares mal definidas. Bem curtos	Muito finos Granulações pequeninas.	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito granular	Crespa umbelicada	—	—	Gravis
G. 974	Tipicos Médios	Muito finos.	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme	Periferia acinzentada	—	>1/200 <1/200	Intermedios
N. 982	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta	—	—	Mitis
N.1021	Coco-bacilos	Mal corados Muito curtos	+	+	—	—	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa preta	—	—	"
G.1027	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito granular	Lisa preta	—	—	Gravis
G.1029	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme	Lisa cinza Periferia mais clara	+	= 1/200	Intermedios
G.1032	Bac. uniformemente Gr +	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa preta	—	—	Mitis
N.1068	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Turvação uniforme	Lisa preta	—	—	"
G.	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Mais ou menos claro Depósito	Lisa preta	—	—	"
G.1156	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Turvação uniforme	Lisa preta	—	—	Intermedios
G.1313	Tipicos Médios	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito granular	Cinza Periferia mais clara	—	—	Gravis
G.1396	Morfologia irregular	Mal corados Granulos apenas perceptiveis.	+	+	—	+	—	—	—	Turvação uniforme	Liso cinza	—	—	Intermedios
G.1428	Tipicos Médios	Mal corados Granulações pequeninas	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Transparente Deposito	Cinza Bordos irregulares	—	—	"
G.1436	Morfologia muito variada.	Tipicos	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme	Lisas Bordos irregulares	—	—	"
G.1535	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	+	Turvação uniforme	Lisas Bordos irregulares	—	—	"
G.1597	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Turvação uniforme	Lisas escuras Periferia mais clara	—	—	"
G.1703	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Mais ou menos transparente Depósito	Lisas pretas brilhantes pequenas	—	—	"
G.1758	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Turvação uniforme	Cinzas Bordos irregulares	—	—	"
G.1782	Tipicos Médios	Mal corados Granulações pouca e finas.	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme Depósito	Lisas pretas brilhantes	—	= 1/300	"
G.1800	Um tanto grossos Médios	Mal corados Pouco perceptiveis nessa coloração	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito granular	Lisas pretas Periferia mais clara	—	—	Gravis
G.1805	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	+	—	—	+	Pelicula Turvação Depósito	Crespas escuras	—	—	Intermedios
G.1831	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme	Lisas pretas brilhantes	—	—	"
G.1878	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Mais ou menos claro Depósito	Crespas escuras	—	—	"
G.1888	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito granular	Lisa escura opaca	—	= 1/100	Gravis
G.1929	Muito curtos	Mal corados Preparação pouco nitida.	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Mais ou menos clara Depósito	Lisa cinza Periferia mais clara	—	—	Intermedios
G.1951	Tipicos Longos	Mal corados Preparação pouco nitida.	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Turvação uniforme	Escura Periferia mais clara	—	—	"
G.1997	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	++	Pelicula Mais ou menos claro Depósito	Lisa cinza Periferia mais clara	—	—	Mitis
G.2001	Tipicos Médios	granulações Raros elementos com	+	+	—	—	—	—	—	Pelicula Turvação uniforme	Lisas pretas brilhantes	—	—	Intermedios
G.2015	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	—	Turvação uniforme	Periferia mais clara Lisas cinza	—	—	"
G.2101	Tipicos Médios	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	—	—	+	—	Pelicula Turvação Depósito	Lisas pretas brilhantes	—	—	Atipica
G.2120	Morfologia irregular	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	—	—	—	+	Pelicula Turvação Depósito	Lisas pretas, brilhantes. Periferia mais clara.	—	—	Interm.
G.2126	Tipicos Longos	Tipicos	+	+	—	—	—	—	—	Pelicula Mais ou menos transparente. Depósito	Lisas pretas	—	—	"
G.2230	Tipicos Médios	Finos. Mal corados. Raras granulações.	+	+	—	+	—	—	+	Pelicula Turvação Depósito	Lisas escuras pequenas.	—	—	"
G.2236	Tipicos Médios	Mal corados Raros elementos com granulações	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Turvação Depósito	Centro saliente Bordos irregulares	—	—	"
G.2297	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula Transparente Depósito	Centro saliente Bordos irregulares pequenos	—	—	"
G.2298	Tipicos Médios	Mal corados Granulações pequenas	+	+	—	+	—	—	+	Turvação uniforme Depósito	Lisas pretas Periferia mais clara	—	—	"
G.2434	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Turvação uniforme Depósito	Lisas pretas brilhantes	—	= 1/500	"
G.2556	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Turvação uniforme	Cinza Periferia mais clara	—	—	"
G.2632	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	—	Pelicula. Turvação. Depósito	Lisas pretas brilhantes	—	—	"
G.2835	Tipicos Curtos	Raras granulações e pequenas	+	+	—	+	—	—	+	Transparente Ligeiro depósito	Lisas pretas brilhantes Crescimento tardio e escuro	—	—	"
G.3001	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	+	+	—	Pelicula Transparente Depósito	Cinza opaca Bordos irregulares	—	—	Gravis
G.3028	Tipicos Médios	Tipicos	+	+	—	+	—	—	+	Mais ou menos claro. Depósito	Lisa preta brilhante	—	—	Intermedios
	Mitis	17		Gravis		8			Interm. 31				Atipicos 1	

Com relação à raça, os trabalhos de Kleine e Kroo (4), Grasset A. Parret-Gentil (5), J. Cauchi e Smith (6). referem um mais alto grau imunitário nos indivíduos de raça negra em detrimento dos brancos. Kinneard (7) em estatísticas realizadas entre negros e brancos duma mesma região refere 90% de negros Schick negativos e sòmente 60% de brancos nas mesmas condições imunitárias.

Nelly e Ramon (8) em pretos do Congo Belga, constataram 95,7% de adultos e 78% de crianças com mais de 1/30 de unidade antitóxica, cifras estas bem mais elevadas que as existentes para pessoas da mesma idade constituintes das populações brancas.

Nossas estatísticas são bem resumidas com referência ao assunto.

Dull e Ferreira (9) no Rio de Janeiro realizando a prova de Schick em 1217 pessoas de ambos os sexos e de diferentes idades, revelam 21,8% de Schick positivos, sendo que 12, 4% são enquadrados nos adultos.

Em 1924, Borges Vieira (11), resumindo estatísticas de Castro Simões, Cavalcanti, B. Vieira de Almeida e a do Posto Experimental, assinala a porcentagem de Schick positivos nas diferentes idades, encontrando entre 12 e 15 anos 21,5%; não faz referência, porém, ao test no adulto.

Ulhoa Cintra (12), em trabalho correlato com o assunto, ainda em São Paulo, refere 28,2% de adultos Schick positivos.

A curva de imunidade natural, bem conhecida hoje, se inicia no recém-nascido pela transmissão passiva dos anticorpos da mãe ao filho através da placenta. Se até 1923 havia alguma dúvida sôbre a transmissão da imunidade antidiftérica na espécie humana por esta via, o trabalho de Kutner e Ratner (13) focalizando o assunto não deixa a menor dúvida sôbre a questão, demonstrando claramente esta transferência de antitoxina em quantidades pràticamente iguais. Interessante será registrar o recente trabalho de Sordelli (14), que levanta dúvidas sôbre a questão, anotando títulos bem diferentes.

Esta imunidade inicial na vida da crianças, que se intensifica ainda pelo aleitamento ao seio materno e que se esgota no prazo. de mais ou menos um ano, é readquirida depois ativa e gradativamente até a idade adulta pelo contato sucessivo com os germes causadores de infecções subclínicas, mas vacinantes.

Apesar de estar fora de dúvida de que a infecção desempenha o principal papel no aparecimento da imunidade à difteria, devemos citar outros fatores ainda não especificados; assim é que Hirszfeld (15) e outros crem na possibilidade de fatores hereditários na determinação do aparecimento dos chamados anticorpos "normais". No caso particular da imunidade antidiftérica Hirszfeld pretendeu demonstrar a correlação existente entre a herança das hemaglutininas (tipos sanguíneos) e da antitoxina diftérica (reação de Schick).

Entre nós ULHOA CINTRA (12) em sua tese de doutoramento estuda êste assunto e confirmando as ideias de HIRSZFELD conclúi que o problema da constituição sorológica" é de suma importância no aparecimento da imunidade antidiftérica no adulto.

Em nossa presente comunicação referiremos o resultado de 250 Schick tests realizados em adultos do sexo feminino, puérperas, e em seus respectivos filhos. Se bem que em pequena escala, acreditamos poder tirar conclusões, naturalmente com reservas, sôbre o índice imunitário das mães e dos recém-nascidos em nosso meio. — As verificações foram realizadas em puérperas e recém-nascidos da Maternidade do Hospital São Paulo, de acôrdo com a técnica abaixo discriminada.

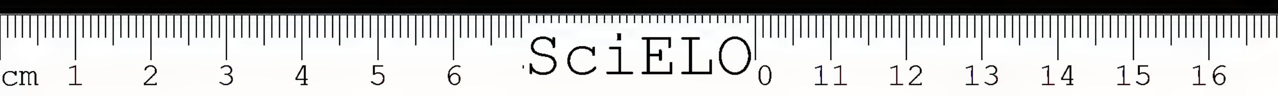
MÉTODOS

Técnica do Schick test — A reação de Schick foi feita de acôrdo com a técnica usual, inoculando-se, com seringa graduada em centésimos e agulha adequada, na derme da face anterior do antebraço, 0,1 cm3 de uma diluição de toxina diftérica em solução tampão de borato, segundo Moloney, representando 1/50 de D.L.M.. A estabilidade da toxina foi continuadamente verificada não só em relação ao seu poder tóxico, como também quanto ao seu poder de combinação com a antitoxina, visando os preceitos recomendados pela Comissão de estandardização biológica da Liga das Nações.

O Schick test está baseado na particularidade de que uma determinada quantidade de antitoxina circulante, usualmente estabelecida como 1/30 ou 1/25 de unidade por cm3 de sôro, é suficiente para salvaguardar a pessoa contra o risco de uma infecção diftérica.

A técnica do Schick test consiste na injeção intracutânea, na fase anterior do antebraço, de uma quantidade de toxina correspondendo a 1/50 da D.M.L. num volume de 0.1 cm3. Sendo o Schick test uma reação em que prevalece o fator quantitativo, importante se torna o uso de uma toxina acuradamente diluida e aferida, para que a reação tenha algum valor. Assim é, que, tanto o diluente como a diluição devem obedecer a condições já estipuladas e tidas como imprescindiveis.

A toxina usada foi por nós diluida em solução tampão de borato segundo a técnica de Moloney. Cuidados especiais foram tomados com o peder tóxico e sua estabilidade e ainda com o poder de combinação da toxina com a antitoxina padrão, visando a técnica de estandardização da Comissão Biológica da Liga das Nações. Assim é, que, pelo preparo da solução de toxina em meio adequado, e pela observação das dosagens exigidas, pudemos observar a estabilidade pelo espaço



de mais ou menos 6 mêses da toxina padronizada, e ainda a porcentagem boa de reações que coincidiram com as dosagens diretas dos soros dos pacientes. Com o fito de distinguir a verdadeira reação produzida pela toxina de possiveis pseudo-reações, resultantes da irritação da pele por constituintes não tóxicos da cultura, foi injetada por via subcutânea, no braço oposto ao da prova, igual quantidade (0.1 cm3) da mesma toxina, mas inativada a 70° por 5 minutos. A leitura das reações foi feita durante o espaço de 4 dias, obedecendo ao seguinte critério:

1° — *Reação positiva* — No braço em que foi inoculada a toxina, aparece, 24 a 36 horas após, uma área circunscrita de eritema no local da injeção, área essa que aumenta de intensidade em coloração, e de tamanho até o 4° e 5° dia para, a seguir, ir desaparecendo gradativamente.

2° — *Reação negativa* — Neste caso há ausência de qualquer área vermelha ou de qualquer outra reação em ambos os braços.

3° — *Pseudo-reação* — Desenvolve-se igualmente em ambos os braços e nas primeiras 24 horas, uma zona vermelha circunscrita e mais azulada que desaparece com rapidez, tornando-se a pele normal no 3° ou 4° dia.

4° — *Reação combinada* — Esta reação é uma combinação da precoce pseudo-reação com o subseqüente desenvolvimento da verdadeira reação à toxina; esta última pode ser lida sem dificuldades no 4° ou 5° dia.

5° — *Reação duvidosa* — Foi considerada reação duvidosa aquela que, não apresentando em 3, 4, ou, eventualmente, 5 dias os caracteristicos de uma reação positiva não era totalmente inexistente, parecendo assim uma reação positiva dissimulada.

A falta de antitoxina foi indicada sòmente pelas reações positivas e combinadas.

Dosagem da antitoxina — As dosagens de antitoxina foram realizadas segundo a técnica usada para o Kellog test, misturando-se as partes iguais de diferentes diluições (1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/100 e 1/150) do sôro com uma diluição de toxina contendo 1/30 de L+ por cm3. As diluições referidas de sôro correspondem respectivamente a 1/30, 1/15, 1/6, 1/3, 3 e 5 U. A. per cm3. De cada mistura, após contato de 1/2 hora à temperatura ambiente, injetaram-se 0,2 de cm3 na derme de cobaias de pêlo branco, pesando, em média, 350 g.

Os resultados das reações foram acompanhados até o 4° dia. Cada cobaia recebeu no máximo 5 inoculações da mistura sôro + toxina, e uma inoculação de 0.1 cm3 de 1/30 do L+ da toxina que serviu como testemunha da reação, indicando a potência necrosante da toxina, de um lado, e de outro o índice reacional da cobaia.

Reação negativa — É aquela em que no local da inoculação nada de anormal se verifica ou apenas se nota uma área vermelha nas primeiras 24 horas, desaparecendo porém logo depois.

Reação positiva — A reação é positiva quando nas 24 e mais acentuadamente nas 48 ou 72 horas seguintes se nota, além da área vermelha inflamatória, uma zona de necrose no ponto de inoculação.

Sempre que a reação testemunha apresentou-se nítida, os resultados foram computados, pois as cobaias não são passíveis de apresentar falsas reações.

Quanto à colheita de sangue foi feita, no caso da mãe, por punção venosa nas veias mediana ou basílica do antebraço e no recém-nascido, da veia do cordão umbilical.

As amostras de sangue foram recolhidas em tubo estéril e os soros separados quer após a retração natural do coágulo, quer por centrifugação.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Pela inspeção do quadro I verifica-se que em 121 mães, 94 apresentam imunidade à difteria (Schick negativas): 20 são sensíveis à toxina, não tendo, portanto, imunidade suficiente, e 7 apresentam-se com reações duvidosas. Nos recém-nascidos nota-se que o número de Schick negativos é maior (105), 15 apresentando reação positiva tipica e aparecendo ainda 3 reações duvidosas.

Quadro I

Relação entre as provas de Schick na mãe e no recém-nascido

	Reações Schick positivas	Reações Schick negativas	Reações duvidosas (atipicas)	Total
Mãe	20	94	6	121
Recém-nascido	15	105	3	123

Ainda com relação às reações, queremos referir, em destaque, reações atípicas do tipo bolhoso, que se apresentaram em 4 puérperas. Esta reação foi surpreendida pela primeira vez no 16º caso observado; no dia seguinte à prova, ao examinarmos a puérpera, notamos que no braço em que fôra praticado o test havia a zona avermelhada característica da reação positiva, e, no centro, uma pequena bolha simulando queimadura. Nos 2 dias subseqüentes, a bolha em questão aumentou de volume, para em seguida desaparecer em 2 ou 3 dias.

O contrôle foi negativo, e no recém-nascido a reação foi positiva com os caracteristicos normais. Suspeitamos inicialmente que a reação estivesse ligada a quelquer infecção secundária da pele. não obstante o carater aquoso do líquido da bolha, e a escrupulosa assepsia com que praticavamos todas as reações. A seguir, porém, novos casos surgiram (No. 26, 59 e 100) sempre com os mesmos caracteristicos. Foi, então, que revendo a literatura em questão, encontramos referência a tal fato no trabalho de FISHER, RUBIN & GREENWALD (16) no qual os autores atribuem o aparecimento de tal reação a um fenômeno semelhante ao de Shwartzman, surgindo, porém, no curso de certas moléstias infecciosas agudas e podendo ou não, corresponder a reações positivas.

Fazendo referências ùnicamente a reações praticadas em creanças, afirmam que a dosagem do teor imunitário no sôro revela pequenas quantidades de antitoxina circulante, suficiente, não obstante para conceder certo grau de imunidade. Devemos assinalar aqui, que nos casos por nós observados a dosagem de antitoxina no sôro de 3 pacientes revelou um índice imunitário abaixo de 0.03, em um caso o nivel se elevando entre 0.03 e 0.06. Em 3 dos pacientes a reação bolhosa corresponderia, portanto, a um grau insuficiente de imunidade. e, no quarto caso. estaria relacionada a um índice imunitário pequeno. Os exames clinicos não revelaram moléstia infecciosa aguda nas 4 pacientes, causa que os referidos autores apontam como provável na reação de tipo bolhoso. É bem verdade que a puérpera experimenta em seu organismo consideráveis alterações gerais e de vários órgãos em particular. Os exames clínicos, porém, de nada referiam de anormal nestas pacientes que as pudesse separar do grupo das 120 puérperas consideradas normais.

Preferimos. assim, registrar esta reação, sem tentar esclarecer por ora sua etiologia.

Queremos também fazer referência às reações observadas no antebraço contrôle, que enunciam a sensibilidade às proteinas do bacilo diftérico. Como era de esperar, nas mães (adultos) esta reação apareceu em número relativamente elevado, sendo em 14 mais ou menos intensa e observando-se em 7 reação ligeira. Nos recém-nascidos sòmente em 6 casos encontramos ligeira reação.

A relação entre a prova de Schick e o teor de antitoxina do sôro foi estudada em 106 mães e 123 recém-nascidos, tendo os titulos antitóxicos de seus soros variado entre 0.033 a 5 unidades.

Pela comparação inicial entre as reações típicas e o teor de antitoxina circulante foram encontradas na puérpera 94 reações que se relacionavam de maneira perfeita com o título antitóxico do sôro, sendo 14 positivas para soros de dosagens inferiores a 0.03, e 80 negativas correspondendo a índice imunitário acima dêste limite.

Foram observadas, por outro lado, 4 reações positivas em relação com títulos antitóxicos baixos (> 0.03 e < 0.06), e 3 reações negativas com teor imunitário < 0.03.

Devemos assinalar ainda 5 reações atípicas ou duvidosas que se relacionavam os títulos limítrofes (> 0.03 < 0.06).

Com referência aos recem-nascidos, em 123 reações realizadas, 120 se mostraram típicas, sendo que destas, 114 estão de acôrdo com as dosagens, sendo 101 negativas para soros de teor imunitário acima de 0.03, e 13 positivas para índices inferiores.

Devemos referir ainda 2 reações Schick positivas relacionadas com índices imunitários baixos (> 0.03 < 0.06) e 3 negativas para dosagens inferiores a 0.03.

A observação evidenciou ainda 3 reações atípicas ou duvidosas das quais 2 estão relacionadas em índices antitóxicos baixos (> 0.03 < 0.06) e uma com dosagem inferior a 0,03.

Os dados que acabam de ser referidos, vêm sumarizados no quadro 11.

Quadro II

Relação entre a prova de Schick e o teor imunitário do sôro

	Reação Schick + com teor imunitário < 0.03	Reação Schick + com teor imunitário > 0.03 < 0.06	Reação Schick — com teor imunitário > 0.03	Reação Schick — com teor imunitário < 0.03	Reações duvidosas ou atípicas com teor imunitário > 0.03 < 0.06	Reações duvidosas ou atípicas com teor imunitário < 0.03	Total
puérperas	14	4	80	3	5		106
recém-nascidos	13	2	101	4	2	1	123

Considerando apenas as reações típicas, encontramos nas puérperas, em 101 reações, 94 relacionadas com a dosagem de antitoxina do sôro e nos recém-nascidos em 120, 114 concordantes.

No recém-nascido, pois, em 120 reações típicas, só 6 se apresentaram em divergência com o título imunitário, isto é, 4 reações que deveriam teòricamente ser positivas não se comportaram como tal e em 2 casos com reação positiva, o sôro revelou título > 0.03 < 0.06.

Os resultados apresentados estão em contradição com os de vários autores que também estudaram a prova de Schick no recém-nascido (Kellogg (19)

Friedberger e Heim (20), Okell (21), Cooke e Sharma (22), entre outros) e que se referem à falta de sensibilidade da pele do recém-nascido à toxina diftérica, mesmo quando a antitoxina circulante está abaixo do mínimo determinado. Sordelli (14) em recente trabalho confirma igualmente esta tese num grupo de 13 recém-nascidos sem antitoxina circulante, acometidos de coriza diftérico, em 11 dos quais observou reação de Schick negativa.

Não pretendemos infirmar teorias já provadas e aceitas; limitar-nos-emos ùnicamente a ressaltar que, em nossas verificações as disparidades não se mostraram tão intensas quanto se poderia calcular em face dos dados anteriormente apresentados. Assim é, que, em 17 recém-nascidos que deveriam apresentar reação positiva dada a ausência de antitoxina no sôro, 13 se comportaram de maneira regular e 4 entraram no número dos insensíveis à toxina.

Assinalaremos ainda os vários resultados obtidos em relação à côr e à nacionalidade.

De 110 puérperas cujos soros foram examinados,

89	eram	brancas,
15	"	pretas,
14	"	pardas e
2	"	amarelas.

No que se refere à nacionalidade a grande maioria é de brasileiras (96) aparecendo 6 portuguesas, 4 talianas, 3 espanholas, 2 lituanas, 2 húngaras, 2 japonesas, 2 jugoslavas, 1 polonesa e 1 alemã.

Embora o número de dados seja insuficiente para um julgamento estatístico, é interessante discriminar as 17 reações de Schick positivas em relação à côr e à nacionalidade.

Assim, em 89 puérperas brancas a reação de Schick foi positiva em 10, registrando-se 2 reações positivas em pretas, num total de 15, 1 em amarela, num total de 2 e 2 em pardas, num total de 14.

Quanto à nacionalidade houve 14 reações positivas brasileiras, num total de 96, 1 em húngara, num total de 2, 1 em japonesa, num total de 2 e 1 em italiana, num total de 4.

Pelo exposto conclúe-se que foi impossível verificar qualquer correlação entre a positividade da reação de Schick e a raça ou a nacionalidade.

Com relação à prova de Schick no adulto, em 121 reações praticadas, 20 foram positivas e 7 duvidosas, sendo que destas, 5 como já foi anotado, correspondiam a mulheres com títulos antitóxicos baixos.

Podemos referir, pois, em nosso meio, uma porcentagem de 16,6 de Schick positivos para adultas, índice um pouco maior que o obtido por Dull e colaboradores no Rio de Janeiro.

Consideremos, finalmente, a relação entre os títulos antitóxicos verificados na mãe e no recém-nascido, que vêm resumidos no quadro III.

O estudo comparativo foi realizado em 110 soros, tendo as dosagens variado entre 0.033 e 5 unidades, pois, infelizmente, o material disponível não permitiu dosagens mais acuradas.

QUADRO III

Relação entre os títulos antitóxicos na mãe e no recém-nascido

Unidades	< 0.03	> 0.3 < 0.06	> 0.06 < 0.17	> 0.17 < 0.3	> 0.03 < 3	> 3 < 5	Total
mães e recém-nascidos	17	21	3	2	54	2	99

Dêstes 110 soros, 99 apresentaram títulos antitóxicos pràticamente iguais na mãe e no recém-nascido.

Nos 11 soros restantes, em 9 o título do sôro da veia do cordão (recém-nascido) é maior que o da mãe, em 2 aparecendo o caso inverso. Como, porém, o método empregado não permite uma aproximação maior dos resultados, não tendo êles variado além dos limites de uma diluição para a imediata, é possível que as discordâncias assinaladadas sejam muito pequenas.

Se computarmos o total das 110 dosagens, verificamos que 17 soros de recém-nascidos e os soros de suas respectivas mães apresentam-se com título antitóxico abaixo de 0.03; ao que parece podemos julgar que a toda a mãe não imune corresponde um recém-nascido susceptível à difteria.

Nesta ordem de ideias é que SORRENTINO (23) propõe e estuda a vacinação antidiftérica em gestantes Schick positivas.

A análise do quadro III evidencia ainda que o maior número de títulos de soros se encontra na escala de dosagem entre 0.3 e 3 u.

Para economia de espaço, omitimos a observação minuciosa de cada caso em particular, com a descrição da reação observada e dos resultados de dosagem da antitoxina no sôro sanguíneo da puérpera e do recém-nascido, protocolos êstes que se encontram arquivados, à disposição dos interessados, na Biblioteca do Instituto Butantan.

RESUMO E CONCLUSÕES

Foram realizadas provas de Schick em 123 puérperas e em seus filhos.

Simùltâneamente foi feita a dosagem da antitoxina circulante no sangue mãe e no sangue do cordão umbelical.

Nos recém-nascidos foram encontradas 15 reações Schick positivas, 105 reações Schick negativas e 3 reações duvidosas.

Em 4 casos, nas mães, apareceram reações do tipo bolhoso, não apresentando as pacientes carater de anormalidade orgânica que pudesse ser ligada à sua etiologia.

Nos filhos das citadas puérperas, a reação de Schick foi positiva, com os característicos normais.

Foram encontradas em 21 adultos reações evidenciando sensibilidade à proteina, sendo 6 de carater ligeiro. Nos recém-nascidos só em 6 casos foram verificadas ligeiras reações no contrôle.

Pela dosagem direta da antitoxina em 106 soros de puérperas e em 123 de recém-nascidos ficou verificado que 17 mães e 18 recém-nascidos possuiam menos de 0.03 de unidade de antitoxina circulante.

No que se refere à prova de Schick no adulto com relação ao teor imunitário, ficou demonstrado mais uma vez que ela é de importância desde que praticada com técnica perfeita.

Quanto à prova no recém-nascido, não tivemos dados que pudessem afirmar a insensibilidade da pele à toxina diftérica, pois em 13 soros sem poder antitóxico, seus pacientes reagiram bem à toxina e apenas em 4 com título antitóxico inferior a 0.03 a reação foi negativa.

No recém-nascido, pois, uma reação de Schick positiva traduz, de uma maneira geral, falta de imunidade à difteria.

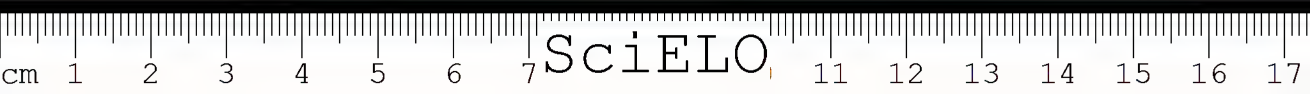
A recíproca também foi observada.

Parece-nos que as reações duvidosas ou atípicas estão geralmente em relação com os títulos imunitários limítrofes.

Pela comparação entre o teor imunitário das mães e dos recém-nascidos pudemos observar títulos antitóxicos pràticamente iguais.

De um modo geral encontramos 16,6 de adultos susceptíveis à difteria em nosso meios, independentemente da raça ou da nacionalidade das pacientes.

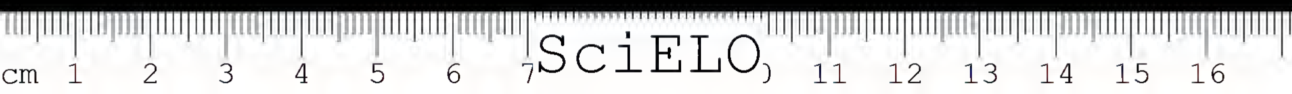
A existência de 11% de recém-nascidos com teor de antitoxina circulante abaixo de 0.03, isto é, susceptíveis à difteria justifica a inclusão desta afecção nas preocupações de diagnóstico diferencial nessa idade.

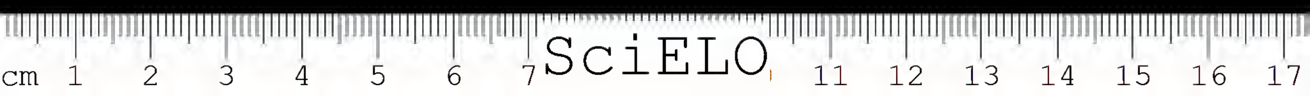


BIBLIOGRAFIA

1. *Abel, R.* (1894). *Deutsche Med. Woschr.*, 20, 692.
2. *Romer, P. H.* (1909). *Zeitscher. f. Immunitatsf.*, 3, 208.
3. *Schick, B.* (1913). *Münch. Med. Woschr.*, 60, 2608.
4. *Keine, F. K. & Kroó, H.* (1930). *Deutsche Med. Woschr.* 56, 46.
5. *Grasset, E. & Perret-Gentil, A.* (1935). *C. R. Soc. Biol.*, 113, 1457.
6. *Cauchi, J. & Smith, E. C.* (1934). *The Lancet*, 227, 1393.
7. *Kinneard, G.* (1935). *Brit. Med. J.*, 1, 201.
8. *Ramon, G. & Nélis, P.* (1935). *Revue d'Immunologie*, 1, 431.
9. *Dull, J. A.; Ferreira, M. J. & Parreiras, D.* (1927). *J. Prev. Med.*, 1, 513.
10. *Bayma, T.* (1916). *Anais Paul. de Med. e Cir.*, 6, (4) :73.
11. *Borges Vieira, F.* (1924). *Bol. Inst. Hig. S. Paulo*, (21).
12. *Barros U. Cintra, A.* (1931). *Tese de doutoramento Fac. Med. S. Paulo.*
13. *Kuttner, A. & Ratner, B.* (1923). *Amer. J. Dis. Children*, 25, 413.
14. *Sordelli, A.* (1940). *Arqus. Inst. Biológico* (S. Paulo), 11, 551.
15. *Korszfeld, L.* (1926). *Ergebn. Hyg. Bakt.*, 8, 367.
16. *Fischer, A. E.; Rubin, B. & Greenwald, Ch. K.* (1940). *Amer. J. Dis. Children*, 60, 304.
17. *Taylor, E. M. & Moloney, P. J.* (1937). *J. Immunol.*, 33, 901.
18. *Fitzgerald, J. G.; Fraser, D. T. & McKinnon, N. E.* (1938). *The Lancet*, 1, 391.
19. *Kellog, W. H.* (1926/27). *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 24, 41.
20. *Friedberger, E. & Heim, Fr.* (1929). *Deutsche Med. Woschr.*, 55, 132.
21. *Odell, C. C.* (1932). *Lancet*, 1, 761, 815, 867.
22. *Cooke, J. V. & Sharma, B. M.* (1932). *Amer. J. Dis. Children*, 44, 40.
23. *Sorrentino, G.* (1931). *Pediatria*, 39, 849.

(Recebido para publicação em dezembro de 1944).




cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

EMPRÊGO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO ESPECÍFICA NA DOSAGEM DO ANTIVENENO CROTÁLICO

POR

J. B. ARANTES, G. KARMANN & OTTO G. BIER

(Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Poucos e contraditórios são os trabalhos que se referem á possibilidade de medir o valor antitóxico dos antivenenos ofídicos tomando como indice a precipitação que êles produzem quando misturados ao veneno homólogo.

Lamb, em 1904, foi o primeiro a se ocupar do assunto e, trabalhando com o sistema veneno-antiveneno *cobra,* chegou à conclusão de que se obtém precipitação com os soros preparados em coelho, mas não com os anti-soros de cavalo.

Em 1909, Calmette & Massol (1) verificam, todavia, também com o antiveneno *cobra,* uma correlação bastante aproximada entre a formação de precipitado e o valor neutralizante (em camundongos) de soros preparados em cavalo, chegando à conclusão de que, ao contrário do que afirmava Lamb, podia o antiveneno *cobra* ser dosado *in vitro* com razoável aproximação

Vital Brazil (2) manifesta-se discretamente sôbre o assunto e, embora assinale que a turvação observada nas misturas de antiveneno (crotálico e botrópico) e veneno homólogo só se desenvolve numa zona estreita vizinha do ponto de neutralização (comprovado mediante injeção venosa no pombo), conclui que a concordância não é perfeita e que, por isso, a verificação de precipitinas não pode ser utilizada para a dosagem exata dos soros antiofídicos. Do mesmo modo, Houssay & Negrete (3), afirmam não haver relação entre o poder precipitante e o poder neutralizante trabalhando com sôro antiofídico polivalente (anti- *C. terrificus - B. alternata - B. neuwiedii*) e veneno de *B. alternata.*

Mais recentemente (1935), Mallick (4), com o sistema sôro anti-*cobra-V.-russellii* mais veneno de *cobra,* chega também à conclusão de que a floculação, segundo Ramon, não pode ser usada para a aferição do antiveneno, embora não seja aparente, dos protocolos de suas experiências, porque se manifesta êle tão pessimisticamente acêrca daquela possibilidade.

À mesma conclusão chegam Ghosh & Kunda, em 1940 (5), havendo, porém, êstes autores, encontrado valores bastante próximos nas titulações feitas *in vivo* (no pombo) e *in vitro* (floculação) do antiveneno *Vipera russellii.*

Nos últimos quatro anos, no Instituto Butantan, um de nós (J.B.A.), vem acumulando dados comparativos das dosagens *in vivo* (por injeção venosa no pombo, segundo VITAL BRAZIL) e *in vitro* (misturas de 1 cm3 de sôro com quantidades variáveis de veneno) de numerosos antivenenos ofídicos preparados em cavalo, tendo chegado à definida impressão de que a precipitação específica pode servir de guia seguro na aferição do sôro contra o veneno da cascavel neotrópica (*Crotalus terrificus terrificus*), embora não o seja no caso do antiveneno botrópico.

No presente trabalho tais resultados são consubstanciados, estabelecendo-se com maior precisão as condições técnicas favoráveis à evidenciação do ótimo de precipitação, quer usando-se o método dito α (DEAN & WEBB), no qual diferentes quantidades de antígeno são adicionadas a uma dose fixa de anticorpo, quer o método inverso (β), segundo RAMON, tal como se usa para a dosagem *in vitro* da antitoxina diftérica e outras.

MATERIAL E MÉTODOS

Antivenenos — Foram usados soros crotálicos monovalentes ou soros antiofídicos mistos (crotálico-botrópico), quer de sangria direta, quer purificados e concentrados.

Solução de veneno — As soluções de veneno foram preparadas a partir do veneno-padrão do Instituto (dessecado 5 dias a 37°C) e geralmente na concentração de 1 mg por ml. Como solvente (e também como diluente no preparo de soluções menos concentradas) usou-se soluto de cloreto de sódio a 0.85% tamponado com fosfatos a pH 7.4 e adicionado de mertiolato na proporção de 1:10000.

Conservadas na geladeira a 4°C, tais soluções de veneno mantêm o seu titulo inalterável durante 15 dias, após o que começam a enfraquecer progressivamente.

Técnica das reações de precipitação — A precipitação das misturas veneno-antiveneno foi estudada quer variando o antígeno, segundo DEAN & WEBB (método α), quer variando o anticorpo (método β), de acôrdo com o método de RAMON.

Em ambos os casos foi o volume final completado a 3 ml com água fisiológica e os tubos imersos em banho-maria a 50°, até 1/3 da coluna liquida neles contida, de maneira a provocar a formação de correntes de convenção, que aceleram a formação de partículas e facilitam-lhes a visibilidade. O tempo total de observação foi de 4-5 horas. Reproduzimos abaixo o protocolo seguido na pesquisa do ótimo de floculação, segundo RAMON e que permite a titulação de soros capazes de neutralizar por ml desde 0.1 até 2.5 mg de veneno (tab. 1).

TABELA 1

Protocolo de dosagem pelo método β (Ramon)

	Sol. veneno 1 mg/ml	Sôro	NaCl 0.85%	Quantidade de veneno neutralizada por 1 ml de sôro
	ml	ml	ml	mg
1	0.25	2.5	0.25	0 10
2	0.25	2.1	0.65	0.12
3	0.25	1.8	0.95	0.14
4	0.25	1.6	1.15	0.16
5	0.25	1.4	1.35	0.18
6	0.25	1.2	1.55	0.21
7	0.25	1.0	1.75	0.25
8	0.25	0.9	1.85	0.27
1	0.25	0.8	1.95	0.31
2	0.25	0.7	2.05	0.35
4	0.25	0.6	2.15	0.41
3	0.25	0.5	2.25	0.50
5	0.25	0.45	2.30	0.55
6	0.25	0.40	2.35	0 62
7	0.25	0.35	2.40	0.71
8	0.25	0.30	2.45	0.83
1	0.25	0.26	2.49	0.92
2	0.25	0.23	2.52	1.09
3	0.25	0.20	2.55	1.25
4	0.25	0.17	2.58	1.47
5	0.25	0.15	2.60	1.66
6	0.25	0.13	2.62	1.92
7	0.25	0.11	2.64	2.27
8	0.25	0.10	2.65	2.50

Técnica das dosagens in vivo — Para as dosagens *in vivo* foi usado o método da injeção venosa em pombos de 300 g, segundo VITAL BRAZIL (2).

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A fim de estabelecer a melhor técnica a seguir na determinação do ótimo de precipitação fizemos uma série de ensâios de tipo "checkerboard", usando um único sôro para determinar os ótimos α e β.

Na tabela 2 (a,b) vêm expressos os resultados obtidos.

TABELA 2

a) Determinação do ótimo de precipitação pelo método de Dean & Webb

Quantidade de veneno, mg.

Quantidades de sôro, ml	2.30	1.90	1.60	1.30	1.10	0.90	0.75	0.60	0.50	0.40	0.35	Ratio $\frac{G}{A}$
0.32							105	27	45	145	220	1.87
0.39						104	15	28	98	130		1.92
0.47				113	40	10	25	75	95	108	125	1.91
0.57			180	30	10	15	40					1.92
0.70		57	37	10	12	42	180					1.86
0.85	65	50	10	34	42	45	60					1.88
1.00		10	13	15	40	50	270					1.90

b) Determinação do ótimo de precipitação pelo método de Ramon

Quantidade de sôro, ml

Quantidades de veneno mg	2.30	1.90	1.00	0.85	0.70	0.57	0.47	0.39	0.32	0.27	0.22	0.19	0.16	Ratio $\frac{G}{A}$
0.35									280	120	65	50	70	1.84
0.40									200	68	50	100		1.81
0.50								130	45	40	140			1.85
0 60						232	115	42	28	50				1.87
0.75					137	55	25	20	246					1.92
0.90	260	240	140	102	38	16	14	42	120					1.91
1.10	90	45	15	10	8	30	135							1.92
1.30				135	10	95								1 86
1.60		250	180	10	60									1.88
1 90			22	38	135									1.90

Vê-se na tabela 2 que o antiveneno estudado se comporta como um sôro do tipo H no sentido de BOYD (6) e que os seus ótimos α e β pràticamente coincidem, as ratios G/A em ambos os casos variando apenas de 1.86 a 1.92 para o ótimo α e de 1.81 a 1.92. no caso do ótimo β. Êste resultado, aliás baseado em floculações feitas com um único antiveneno, está em oposição ao ponto de vista expendido recentemente (1944) por BOYD & TURNELL (7) de que os ótimos α e β jamais podem coincidir.

Conhecido o fato que os ótimos α e β frequentemente cáem na zona de equivalência, fizemos algumas verificações dos sobrenadantes correspondentes a tais precipitados e pudemos realmente comprovar, mediante injeção venosa em camundongos, a inexistência de veneno livre. Esta verificação é consubstanciada pela concordância entre as dosagens *in vivo* e *in vitro* de diferentes antivenenos crotálicos, tal como se pode ver na tabela 3.

TABELA 3

Concordância entre as dosagens in vivo *(pombo) e* in vitro *(floculação) de diferentes antivenenos crotálicos*

Antiveneno	Dosagem *in vivo*: quantidade de veneno neutralizada por 1 ml de antiveneno	Dosagem *in vitro*: quantidade de veneno que flocula ótimamente com 1 ml de antiveneno	Ratio $\frac{in\ vivo}{in\ vitro}$
	mg	mg	
C 30	0.10	0.92(*)	0.98
		0.92	
		0.92	
		0.96	0.94
		1.09	0.82
C 29	2.10	1.78(*)	1.2
		1.64	1 3
C 178	0.50	0.50	1.0
C 193	0.30	0.27(*)	1.1
		0.27	
C 011	0.40	0.35	1.1
C 016	0.45	0.41	1.1
C 006	0.30	0.20	1 5
C 014	0.25	0.27	0.93
C 015	0 45	0.41	1.1
324	0.50	0.41	1 2
424 (**)	0.60	0 62	0.97

(*) Dosagens repetidas com diferentes soluções de veneno.
(**) Sôro antiofídico misto capaz de neutralizar por ml. 0.6 de veneno crotálico e 1.2 de veneno botrópico.

A relação $\frac{in\ vivo}{in\ vitro}$ foi, na maioria das vezes, muito próximo de 1, só tendo havido um afastamento apreciável no caso dos soros C 29 e C 006. Tais desvios, que aliás são muito pequenos quando comparados, p. ex^{o}, com os observados na dosagem do sôro antidiftérico, não invadem o valor da floculação na dosagem dos soros anti-ofídicos, uma vez que esta indica a dose justamente neutralizada

por um certo volume de sôro (Lo), ao passo que a dosagem *in vivo* indica um valor frequentemente intermediário entre Lo e L+ (daí ser a ratio $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$ quase sempre superior a 1.0).

CONCLUSÕES

1. A reação de floculação específica observada entre o veneno e o antiveneno crotálico mostra ótimos α e β pràticamente coincidentes e que correspondem à zona de neutralização.

2. Comparando-se os resultados das dosagens *in vivo* (método de VITAL BRAZIL) e *in vitro* (floculação) de uma série de antivenenos crotálicos, obteve-se uma ratio $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$ muito próxima de 1. Daí a conclusão de que a floculação específica poderá servir como um guia seguro na aferição do antiveneno crotálico.

ABSTRACT

1. The optimal proportions ratios are very close for the system *Crotalus terrificus* venom-antivenin, when determined either by the alpha (DEAN & WEBB) or the beta methods (RAMON).

2. The comparative titration of a series of *Crotalus* antivenins, by using the flocculation and pigeon methods, showed a $\frac{\text{in vivo}}{\text{in vitro}}$ ratio very near to 1.0.

3. The conclusion is drawn that the flocculation reaction is a reliable index for the tiration of the neutralizing potency of *Crotalus* antivenins.

BIBLIOGRAFIA

1. *Calmette, A. & Massol, L.* (1909). Les précipitines du sérum antivenimeux vis-à-vis du venin de cobra. *Ann. Inst. Pasteur*, **23**, 115.
2. *Vital Brazil* (1914). La défense contre l'ophidisme. Pocai-Weiss & Cia., São Paulo, Cf. pág. 246.
3. *Houssay, B. A. & Negrete, J.* (1917). Propriedades precipitantes específicas de los sueros antiofídicos. *Rev. del Inst. Bacteriológico del Dep. Nac. de Higiene*, **1**, 15-31.
4. *Mallick, S. M. K.* (1935). The applicability of flocculation tests for standardization of antivenene. *Indian J. Med. Res.*, **23**, 525-529.
5. *Ghosh, B. N. & Kundu, N. L.* (1940). The reaction between *Vipera russellii* venom and its antivenene. *Ind. and J. Med. Res.*, **27**, 1121-1127.
6. *Boyd, W. C.* (1943). Fundamentals of Immunology. Interscience Publ., Inc., New York, Cf. pág. 215-219.
7. *Boyd, W. C. & Turnell, M. A.* (1944). The essential difference between the two optimum proportions flocculation ratios. *J. exper. med.*, **80**, 289-298.

(Recebido para publicação em maio de 1945).

ESTUDO QUANTITATIVO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO ENTRE O VENENO E O ANTIVENENO CROTÁLICO

POR

OTTO G. BIER

(com a assistência técnica de MARIA BRAZIL ESTEVES)

(Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

ARANTES, KARMANN & BIER (1) demonstraram que a reação de floculação observada entre o veneno de *Crotalus t. terrificus* (cascavel neotrópica) e o respectivo antiveneno deve ser considerada como uma reação antígeno-anticorpo específica, em vista da estreita correlação *in vivo - in vitro* por êles verificada, experimentando o veneno em relação a um grande número de partidas de antiveneno.

Uma vez que os métodos quantitativos desenvolvidos para a dosagem das precipitinas (2) foram aplicados com sucesso ao estudo da reação toxina-antitoxina, quer no caso da toxina diftérica (PAPPENHEIMER & ROBINSON, 1937), quer no caso da toxina escarlatínica (HOTTLE & PAPPENHEIMER, 1941), pareceu-nos que tal técnica devera ser aplicada também ao sistema V-A crotálico. A intenção foi a de obter, assim, dados importantes para a avaliação da atividade imunológica do veneno puro, independentemente do seu isolamento, bem como para a determinação quantitativa do antiveneno.

MATERIAL E MÉTODOS

Solução de veneno — As soluções de veneno foram preparadas adicionando-se o veneno sêco padrão do Instituto, na proporção de 0,4%, a um soluto hipertônico de NaCl (1.5%), de acôrdo com a técnica aconselhada por VITAL BRAZIL (5), a qual permite assegurar rápida e completa dissolução.

Esta solução-mãe foi conservada na geladeira sem adição de qualquer preservativo e usada dentro de 3 a 4 dias, no máximo, preparando-se diluições da mesma em soluto isotônico de NaCl (0.9%) que, antes de serem usadas nas experiências de floculação, eram centrifugadas na câmara fria a 2000 r.p.m. durante meia hora, a fim de obter-se um sobrenadante perfeitamente límpido.



Antivenenos — Foram usadas três partidas diferentes de antiveneno crotálico, sob a forma de sôro de cavalo hiperimune, não purificado, de sangria direta feita, no máximo, oito dias antes das experiências. O sôro, separado do coágulo por sifonagem, foi centrifugado no dia seguinte, deixado em repouso durante mais 24 a 48 horas em câmara fria e novamente centrifugado, a 2000 r.p.m. meia hora, no dia da experiência.

As três partidas de antiveneno utilizadas, correspondentes aos cavalos de números 152, 190 e 188, neutralizavam respectivamente 0.22 - 0.40 e 0.54 mg de veneno de *Crotalus t. terrificus* per ml de antiveneno, sendo as dosagens feitas no pombo, pela via intravenosa, de acôrdo com o método de uso corrente no Instituto.

Técnica das reações de precipitação — De cada antiveneno determinou-se o ótimo de floculação, quer usando-se o método α (proporções ótimas, segundo Dean & Webb), quer o método β (Ramon). No primeiro caso, a 2 ml de sôro adicionaram-se quantidades variáveis de veneno, igualando-se os volumes com água fisiológica; no segundo caso, a 2.5 ml de uma solução contendo 0.1 mg de veneno per ml, adicionaram-se quantidades variáveis de sôro, igualando-se também os volumes finais com solução isotônica de NaCl.

Os tubos foram imersos, então, em banho-maria a 50°C até uma altura correspondente a cêrca de 1/3 do seu conteúdo, fazendo-se leituras em intervalos repetidos, a fim de registrar o ótimo de floculação.

Nas experiências quantitativas, a porções de 4-5 ml de sôro adicionaram-se quantidades variáveis de um soluto de veneno contendo 1 mg per ml, misturando-se cuidadosamente o conteúdo dos tubos e deixando-se completar a precipitação durante a noite na geladeira.

Determinação de nitrogênio nos precipitados — Após centrifugação (na câmara fria) e decantação dos sobrenadantes, os precipitados foram desagregados e lavados três vezes com água fisiológica gelada, procedendo-se à recentrifugação dos sobrenadantes, de acôrdo com a referência (6). As análises foram feitas em duplicata, só se considerando satisfatórios os resultados compreendidos dentro de um êrro de ± 3%; ocasionalmente, quando os valores mais baixos não estiveram compreendidos dentro daquela variação, foram êles desprezados, computando-se apenas o valor superior.

As determinações de nitrogênio foram feitas pelo método micro-Kjeldahl, segundo a técnica de Meeker & Wagner, recebendo-se a amônia acarretada por uma corrente de vapor dágua em soluto saturado de ácido bórico e titulando-se diretamente com HCl n/70.

RESULTADOS

Os resultados das determinações quantitativas feitas com três diferentes antivenenos figuram nas tabelas 1, 2 e 3.

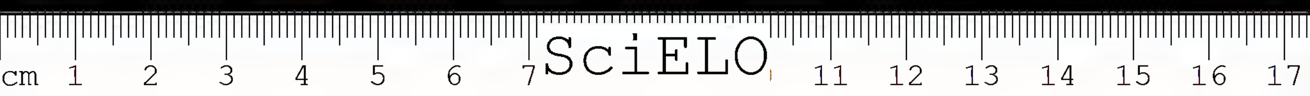


TABELA I

Floculação quantitativa do sôro crotálico 190

Quantidades crescentes de veneno adicionadas a 4 ml de antiveneno.

I Sol. veneno 1 mg. per ml	II N-veneno (*)	III N-precipitado	IV N-antiveneno (III - II)	V Ratio N-antiveneno / N-veneno (IV - II)	VI Ótimo de floculação
ml	mg	mg	mg		α) 0.77 mg de veneno para 2 ml de sôro. Ratio: 2.6 β) 0.6 ml de sôro para 0.25 mg de veneno. Ratio: 2.4. Tempo de floculação: 30 min.
1.1	0.0824	1.164	1.052		
1.2	0.0898	1.202	1.112		
1.3	0.0973	1.311	1.214		
1.4	0.1048	1.398	1.293	12.3	
1.5	0.1123	1.425	1.312	11.7	
1.6	0.1198	1.408	1.288	10.7	
1.7	0.1273	1.420	1.292	10.1	
1.8	0.1348	1.404	1.269	9.4	

(*) Calculado da seguinte maneira: Cada ml do soluto de veneno empregado continha, em realidade, 0.78 mg de veneno crú (descontando-se 12% de água contidos no veneno padrão pulverulento).

Sôbre a base do rendimento máximo de crotoxina obtido por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT (7) e que é de cêrca de 60%, pode-se calcular que 0.78 mg de veneno crú contém 0.468 mg de crotoxina, ou sejam, 0.468: 6,25 = 0.07488 mg de N-crotoxina.

TABELA II

Floculação quantitativa do sôro crotálico 188

Quantidades crescentes de veneno adicionadas a 4 ml de antiveneno.

I Sol. veneno 1 mg per ml	II N - veneno	III N-precipitado	IV N-antiveneno (III - II)	V Ratio N-antiveneno / N-veneno (IV - II)	VI Ótimo de floculação
ml	mg	mg			α) Não pode ser determinado com exatidão. β) 0.6 ml de sôro para 0.25 mg de veneno. Ratio: 2.4. Tempo de floculação: 150 min.
1.1	0.0824	0.138			
1.2	0.0898	0.386			
1.3	0.0973	0 679			
1.4	0.1048	0.931	0.826		
1.6	0.1198	1.340	1.220	10.2	
1.7	0.1273	1.442	1.315	10.3	
1.8	0.1348	1.586	1.451	10.8	

TABELA III

Floculação quantitativa do sôro crotálico 152

i) Quantidades crescentes de veneno adicionadas a 4 ml de antiveneno.

I Sol. veneno 1 mg per ml	II N-veneno	III N-precipitado	IV N-antiveneno (III - II)	V Ratio N-veneno / N-antiveneno (IV - II)	VI Ótimo de floculação
ml	mg	mg	mg		α) 0.46 mg de veneno para 2 ml de sôro. Ratio: 4.3. β) 1.13 mg de sôro para 0.25 mg de veneno. Ratio: 4.5. Tempo de floculação: 60 min.
0.8	0.0599	0.532	0.472		
0 9	0 0674	0.723	0.655	9.7	
1.0	0.0749	0 696	0.621	8.3	
1.1	0.0824	0 674	0.591		
1.2	0.0898	0.540	0.450		
ii) Quantidades crescentes de veneno adicionadas a 5 ml de antiveneno					
1.2	0.0898	0.856	0.766	8.5	
1.3	0.0973	0.819	0.721		
1.4	0.1048	0.647	0.542		
1.5	0.1123	0.410			

DISCUSSÃO

Os dados quantitativos apresentados indicam que a floculação entre o veneno e o antiveneno crotálico, tal como acontece com a reação toxina-antitoxina diftérica, apresenta uma faixa mais ou menos estreita na qual o valor de N-precipitado passa por um máximo, decrescendo abruptamente abaixo ou acima desta zona ótima.

Avaliando-se em 60% o teor de veneno puro (crotoxina) contido no veneno crú (7) pode-se calcular o N correspondente ao veneno e, por subtração do N-precipitado, o N correspondente ao antiveneno.

Verifica-se, assim, que a ratio N-antiveneno: N-veneno, no tubo correspondente ao máximo de N-precipitado variou, nos três soros experimentados, entre 9.7 e 11.7. Tomando-se, por exemplo, o valor 11 para tal relação, admitindo que o antiveneno é uma globulina de pêso molecular igual a 180.000 e que o precipitado formado entre veneno e antiveneno crotálico, no ponto de floculação ótima tem a mesma composição molecular (GA_2) que os precipitados nos sistemas toxina-

antitoxina diftérica e ovalbumina-antiovalbumina (de cavalo), chega-se à conclusão de que o pêso molecular da crotoxina deve ser próximo de 33.000 $\left(\frac{2 \times 180.000}{11}\right)$.
Ora, êste é justamente o valor atribuido por SLOTTA & FORSTER (8), ao pêso molecular da crotoxina, calculado pelo teor de metionina. A uma ratio de 12 corresponderia um pêso molecular de 30.000: segundo as determinações de GRALÉN & THE SVEDEBERG (9), o pêso molecular da crotoxina é de 30.500.

Quanto ao N correspondente ao antiveneno, atingiria, para os soros 190, 188 e 152, respectivamente os valores de 1.312 - 1.451 e 0.655 para 4 ml de sôro, ou seja de 328, 363 e 164 mg per ml, valores que estão de acôrdo com o poder neutralizante dos soros correspontes e que permitem aferir a atividade do antiveneno crotálico na base de cêrca de 600 mg de N-antiveneno para a neutralização de 1 mg de veneno bruto (ou 0.6 mg de crotoxina).

As especulações teóricas expostas têm, porém, valor limitado, sendo necessário comprová-las à custa de dados quantitativos que permitam o cálculo direto da ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno na zona de equivalência. Estudos quantitativos com a crotoxina são também claramente indicados.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. O estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o antiveneno crotálico conduz a resultados semelhantes aos que se observam na reação toxina-antitoxina diftérica.

2. Os dados quantitativos apresentados não permitiram calcular a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno. Avaliando-se esta, porém, em função do pêso molecular da crotoxina, chega-se a interessantes conclusões sôbre a atividade imunológica do veneno puro e do antivenepo, que são brevemente discutidas no texto.

ABSTRACT

1. The quantitative course of the reactions is very similar for *Crotalus t. terrificus* venom-antivenin and diphtheria toxin-antitoxin systems.

2. From the data obtained so far it was impossible to calculate the ratio N-antivenin :N-venom in the precipitate formed within the equivalence zone.

However, when this ratio is determined on the basis of the molecular weight attributed to crotoxin, interesting conclusions may be drawn regarding the immunological activities of venom and antivenin which are briefly discussed in the text.

BIBLIOGRAFIA

1. *Arantes, J. B., Karmann, G. & Bier, O. G.* (1945). Emprêgo da reação de floculação específica na dosagem do antiveneno crotálico. *Memórias do Instituto Butantan*, 18, 172-177.

2. *Heidelberger, M.* (1939). Quantitative absolute methods in study of antigen-antibody reactions. *Bacteriological Rev.*, 3, 49.

3. *Pappenheimer, A. M., Jr. & Robinson, E. S.* (1937). Quantitative study of Ramon diphtheria flocculation reaction. *J. Immunol.*, 32, 291-300.

4. *Hottle, G. A. & Pappenheimer, A. M., Jr.* (1941). A quantitative Study of the Scarlet Fever Toxin-Antitoxin Flocculation Reaction. *J. exp. Med.*, 74, 545-546.

5. *Vital Brazil* (1908). A defesa contra o Ophidismo. Pocai-Weiss & Cia., São Paulo, Cf. pág. 60.

6. *Heidelberger, M. & Kabat, E. A.* (1938). Chemical studies on bacterial agglutination: quantitative data on pneumococcus R (Dawson S) - anti-R (S) systems. *J. exp. Med.*, 67, 545-550. *Alexander, H. E. & Heidelberger, M.* (1940). Chemical studies on bacterial agglutination; agglutinin and precipitin content of antisera to Haemophilus influenzae, type B. *J. exp. Med.*, 71, 1-11.

7. *Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* (1939). Estudos químicos sôbre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel. *Memórias do Instituto Butantan*, 12, 505-512.

8. *Slotta, C. H. & Forster, W.* (1939). Estudos químicos sôbre os venenos ofídicos. 5. Determinação quantitativa dos componentes que contêm enxofre. *Memórias do Instituto Butantan*, 12, 513-521.

9. *Gralén, N. & The Svedberg.* (1938). The molecular weight of crotoxin. *Biochem. J.*, 32, 1375-1377.

(Recebido para publicação em março de 1945).

DESENCADEAMENTO DO FENÔMENO DE SHWARTZMAN EM COELHOS MEDIANTE A INJEÇÃO VENOSA DE GLICOGÊNIO PURO

POR

OTTO G. BIER & JANDYRA P. DO AMARAL

(Dos Laboratórios de Bacteriologia e de Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Dentre numerosas substâncias ensaiadas com o fim de provocar a baixa do teor de plaquetas sanguíneas (goma acácia, amido solúvel, polisacárides extraidos do liquido hidático ou de extratos de *Ascaris lumbricoides*, glicogênio), referem recentemente (1945) ROCHA E SILVA, GRAÑA & PORTO (1) que o glicogênio atúa de maneira excepcional, ocasionando, já na dose de 5 mg per quilo, uma plaquetopenia de cêrca de 90%, minutos após a injeção intravenosa em coelho.

Pareceu-nos importante, do ponto de vista de elucidação do mecanismo do fenômeno de Shwartzman, verificar se tal reação podia ser desencadeada pela injeção intravenosa de glicogênio, tanto mais quanto, além dos filtrados bacterianos e dos precipitados específicos, sòmente se lograra observar o desencadeamento daquele fenômeno por meio de suspensões de agar (SICKLES, 1931) ou de amido solúvel (FREUND & HOSMER, 1935).

PARTE EXPERIMENTAL

Coelhos brancos depilados na véspera, ao nível da região abdominal, foram injetados intradèrmicamente com 0.25 ml de "agar washings" de culturas de meningococo de 24 horas em agar-sangue (adição de 10 ml de água fisiológica fenicada a 0.4% a cada garrafa de Roux de cultura, centrifugação enérgica).

24 horas após a preparação intradérmica, procedeu-se à injeção intravenosa desencadeante de extrato meningocócico (contrôle), bem como de quantidades variáveis de glicogênio (de 10 a 300 mg per quilo).

O glicogênio usado (1) foi extraido de figado e purificado por precipitações sucessivas com álcool; dissolvido na proporção de 25% em água distilada, a quente, produz uma solução quase perfeita, apenas com ligeira opalescência.

(1) Gentilmente cedido pelo DR. M. ROCHA E SILVA, do Instituto Biológico de S. Paulo, a quem aproveitamos a oportunidade para agradecer.

Os resultados de uma série típica de experiências vêm resumidos na tabela 1.

TABELA 1

Incidência da reação hemorrágica de Shwartzman em coelhos preparados com extrato meningocócico após injeção do mesmo extrato ou de quantidades variáveis de glicogênio.

Coelho N.°	Substância desencadeante	Intensidade da reação hemorrágica	Tempo de aparecimento da reação
			horas
191	Extrato meningo, 1ml/kg	++++	3
172	"	++++	3
121	Glicogênio, 300 mg/kg	++++	3
194	"	++++	1
232	"	++++	1
164	Glicogênio, 100 mg/kg	++++	1
178	"	++++	1
218	"	++++	1
201	Glicogênio, 30 mg/kg	++++	1
163	"	++++	1
189	"	—	—
143	Glicogênio, 10 mg/kg	—	—
50	"	—	—
123	"	—	—

DISCUSSÃO

Pode-se ver na tabela 1 que em dose superior a 100 mg por quilo o glicogênio desencadeou ràpidamente (dentro de 1 hora) forte reação hemorrágica em 100% dos coelhos preparados de véspera mediante a injeção de 0.25 ml de extrato meningocócico. Na dose de 30 mg/kg houve forte reação hemorrágica, também dentro de 1 hora, em 2 de 3 coelhos experimentados, ao passo que com 10 mg, o resultado foi sempre negativo.

A potência desencadeante do glicogênio parece ser mais intensa do que a verificada por FREUND & HOSMER com o amido solúvel que, na dose de 1 g (para coelhos de 1 a 3 quilos), só produz 100% de reações positivas nos coelhos

de pêso superior a 2 quilos, sendo geralmente negativos os resultados obtidos nos animais de pêso compreendido entre 1 e 2 quilos.



Fig. 1

Necrose hemorrágica intensa em coelho preparado mediante a injeção intradérmica de 0.25 ml de extrato meningocócico, 48 horas após a injeção desencadeante de 100 mg de glicogênio por quilo.

Em nossas experiências usamos sempre coelhos de cêrca de 1 500 g, nos quais obtivemos pràticamente 100% de reações de Shwartzman intensa e ràpidamente positivas, até com 30 mg/kg de glicogênio. A correlação entre a idade do coelho e a capacidade de reagir verificada por Freund & Hosmer para o amido não se observa, pois, no caso do glicogênio. Possivelmente a ação plaquetopênica do glicogênio, sendo superior à do amido, independe de fatores relacionados com a idade do animal.

CONCLUSÃO

O fenômeno de Shwartzman pode ser desencadeado com impressionante rapidez e intensidade em coelhos preparados pela injeção intradérmica de extrato meningocócico, mediante a injeção venosa de pequenas doses de glicogênio (até 30 mg per quilo). É altamente sugestiva a hipótese de que tal efeito provocado quer pelo glicogênio, quer pelo amido, deva ser atribuido à intensa ação plaquetopênica das referidas substâncias.

ABSTRACT

The introduction of glycogen into the blood stream of rabbits led to the development of rapid and severe hemorrhagic necrosis in the skin at the site of injection of meningococcus extract.

The reacting potency of glycogen is very high (even 30 mg/kg produced intense hemorrhages in 2 of 3 rabbits) and the frequency of reactions did not vary with the weight of the rabbits.

The hypothesis that this action of glycogen (and also of starch) may be due to a decrease of the circulating platelets is highly suggestive and deserves further speculation.

BIBLIOGRAFIA

1. *Rocha e Silva, M., Graña, A. & Porto, A.* (1945). Inhibitory Effect of Glycogen upon Anaphylactic Shock in the Rabbit. *Proc. Soc. exp. biol. and med.*, **59**, 57-61.

2. *Shwartzman, G.* (1937). Phenomenon of Local Skin Reactivity. Paul B. Hoeber, Inc., New York.

3. *Sickles, G.* (1931). Local skin reaction obtained by intravenous injection of agar following intracutaneous inoculation of meningococcus toxin. *Journ. Immunol.*, **20**, 169-172.

4. *Freund, J. & Hosmer, E. P.* (1935). Hemorrhagic Reaction at the Site of Injection of Toxins after intravenous Injection of Starch in young and adult Rabbits. *Journ. Immunol.*, **29**, 279-283.

(Recebido para publicação em abril de 1945).



ESTUDOS SÔBRE A QUIMIOTERAPIA DA INFECÇÃO MENINGOCÓCICA EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO; DERIVADOS AMINADOS DA DIFENILSULFONA E SUBSTÂNCIAS ANTIBIÓTICAS DE ORIGEM MICROBIANA (PENICILINA E PIOCIANINA)

POR

E. BIOCCA, J. P. DO AMARAL & OTTO G. BIER

(Do Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Numerosos são os trabalhos que versam sôbre a ação da sulfanilamida e seus derivados nas infecções meningocócicas humana e experimental. De particular importância, no tratamento das meningites humanas, é que a droga atinja no liquor uma concentração terapeuticamente suficiente, destacando-se por esta propriedade, aliada a uma ação bacteriostática intensa, a sulfadiazina.

O uso associado das sulfas ao sôro específico é também assinalado como particularmente eficaz.

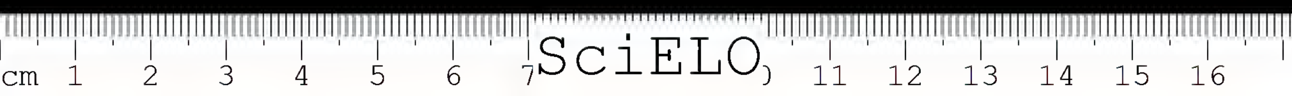
Com o intuito de encontrar agentes terapêuticos mais vantajosos do que os atualmente conhecidos, procedemos a algumas experiências na infecção meningocócica experimental em camundongos, nas quais ensaiamos comparativamente a atividade quimioterápica de seis derivados aminados da difenilsulfona, bem como de duas substâncias antibióticas produzidas por microorganismos (penicilina e piocianina).

No que concerne às sulfonas, embora a 4-4'-diamino-difenilsulfona tenha sido sintetizada em 1908 por FROM e WITTMANN, só em 1937 foi ela experimentada em provas quimioterápicas por BUTTLE e colaboradores.

Logo a seguir foram ensaiados o derivado diacetílico (Rodilone), por FOURNEAU e colaboradores (1937), e o formil-derivado (Formilone), por NITTI, BOVET e HAMON, em 1938.

Recentes estudos na quimioterapia da tuberculose vieram focalizar a importância de certas sulfonas, tais como o Promin e o Diasone, que são derivados de bases de Schiff, pois provêm da reação do grupo amínico da sulfona com aldeídos.

Uma série de novos derivados da 4-nitro-4'-amino-difenilsulfona foi sintetizada por MINGOJA (4), sendo tais produtos ensaiados por um de nós (5) na toxoplasmose experimental e, menos extensivamente, na infecção pneumocócica do camundongo. Observámos, em tais ensaios, que os derivados contendo um H



amínico substituido por um radical alifático possuiam elevado valor quimioterápico, aliado a uma toxidez relativamente baixa. Dentre os produtos estudados, os mais ativos foram os acil-derivados, que possuiam o menor número de átomos de C na cadeia lateral e, portanto, entre êles, o formil-derivado.

Nas experiências referidas no presente trabalho, propuzemo-nos a verificar: 1) si os derivados da série 4-4'-diamino-difenilsulfona eram mais ou menos ativos do que os correspondentes da série 4-nitro-4'-amino-difenilsulfona; 2) si também na infecção meningocócica o formil-derivado era mais ativo do que o acetil-derivado, que possui um átomo de C a mais na cadeia lateral; 3) qual a atividade antimeningocócica do derivado tricloracetílico da 4-4'-diamino-difenilsulfona.

Quanto aos agentes bioquimioterápicos, possui a penicilina, no tratamento das meningites, uma decidida vantagem sôbre a maioria dos derivados sulfanilamídicos e sulfônicos, que é a de poder ser introduzida diretamente no canal raqueano. A rápida eliminação que o organismo faz dêste produto, não representa um inconveniente ponderável, em infecções de decurso tão rápido como as meningocócicas. Observações recentes (6) evidenciam a atividade antimeningocócica da penicilina na infecção experimental do camundongo. Nosso objetivo foi o de controlar estas pesquisas, usando diferentes amostras de meningococos e quantidades variáveis de penicilina.

A piocianina, o pigmento azul da *P. aeruginosa*, apesar de muito bem conhecida sob o ponto de vista químico (N-metil-a-hidroxifenazina) tem sido pouco estudada sob o ponto de vista da sua atividade *in vivo*, não sendo de nosso conhecimento qualquer trabalho relacionado com o ensaio de sua atividade quimioterápica na infecção meningocócica experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Sulfonas — Das sulfonas ensaiadas quatro eram derivados da 4-4'-diamino-difenilsulfona (formil, acetil e tricloracetil-derivados, Diasone) e dois o eram da 4-nitro-4'-aminodifenilsulfona (formil e acetilderivados).

Substâncias antibióticas — Foi usada a penicilina sêca existente no comércio para uso terapêutico, proveniente dos Laboratórios Parke, Davis & Co., de Detroit, Mich. Dissolvido o produto em água distilada esteril, foi o seu título (em unidades Oxford) reverificado, pelo método usual.

A piocianina empregada foi purificada por recristalizações sucessivas, tendo-se a precaução de não expô-la excessivamente à luz depois de dissolvida, por se tratar de uma substância fotoquímicamente sensível.



Técnica — A infecção experimental dos camundongos foi feita com diferentes amostras de meningococos da coleção do Instituto Butantan, usando-se suspensões em mucina, de acôrdo com a técnica já conhecida.

O ensaio quimioterápico foi precedido da determinação da virulência da cultura de meningococo utilizada, sendo cada experiência acompanhada pelos indispensáveis contrôles, injetados com o mesmo número de D.L.M. que os animais tratados.

A observação dos camundongos foi feita durante quatro dias, considerando-se como não protegidos todos os mortos antes do 5.º dia da infecção e tomando-se em consideração apenas as provas, nas quais todos os contrôles morreram dentro daquêle prazo.

As sulfonas (e a sulfanilamida incluida para comparação) foram injetadas sob a forma de suspensão oleosa a 2.5%; a penicilina e a piocianina, em solução aquosa. Duas a três horas antes da injeção infetante, os camundongos (20 g. ± 10%) receberam subcutaneamente 0.5 cm³ da suspensão oleosa da droga em exame. A suspensão de meningococos em mucina foi injetada por via intraperitoneal, na quantidade correspondente ao número de D.L.M. desejado.

Quanto às diluições de penicilina, foram injetadas nas quantidades e segundo as modalidades indicadas na tabela 2.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 resumem os resultados das experiências realizadas.

Tabela 1

Ação de diferentes sulfonas na infecção meningocócica experimental do camundongo.

DROGA	MENINGOCOCO 39 TIPO III 1-10 DLM	10-100 DLM	100-1000 DLM
NH.CO.H — SO_2 — NH.CO.H FORMILONE	* 8/8	8/8	1/4
$NH.CO.CH_3$ — SO_2 — $NH.CO.CCl_3$ RODILONE	7/8	4/8	0/4
$NH.CO.CCl_3$ — SO_2 — $NH.CO.CH_3$ DICLORONE	8/8	4/8	0/4
$NH.CH_2.SO_2Na$ — SO_2 — $NH.CH_2.SO_2Na$ DIASONE	—	7/8	4/4
NO_2 — SO_2 — NH.CO.H 117 M	6/8	3/8	0/4
NO_2 — SO_2 — $NH.CO.CH_3$ ACETIL D	5/8	1/8	1/4
NH_2 — $SO_2.NH_2$ SULFANILAMIDA	3/8	2/8	2/4
CONTRÔLES	0/16	0/8	0/8

* O numerador indica o número de sobreviventes e o denominador o total de animais inoculados.

Tabela 2

Penicilinoterapia da infecção meningocócica experimental no camundongo.

Dose e modo de administração da penicilina	Meningo 33 Tipo II 1-10 DLM	Meningo 27 Tipo IV 1-10 DLM	Meningo 39 Tipo III 1-10 DLM	Meningo 17 Tipo I 1-10 DLM
Dose única de 100 u. O. 2 horas após a infecção: total — 100 u. O.	3/4	1/4	4/4	2/4
Duas doses de 100 u. O., 2 e 4 horas após a infecção: total — 200 u.O.	4/4	4/4	4/4	3/4
Quatro doses de 100 u.O., 2, 4, 6 e 8 horas após a infecção: total — 400 u. O.	4/4	4/4	3/4	4/4
CONTRÔLES	0/4	0/4	0/4	0/4

Em três séries de experiências feitas com a piocianina em relação às raças M 39 e M 52 verificou-se ação protetora praticamente nula.

COMENTÁRIOS

Como se pode facilmente verificar na Tabela 1, há uma evidente diferença entre os resultados obtidos quando a infecção é feita com poucas doses mínimas letais de meningococos (1 - 10 e 10 - 100) ou com um número elevado (100 - 1000). No primeiro caso é possivel obter uma proteção bem evidente com várias sulfonas, o que permite, de certa maneira, fazer confrontos das diferentes atividades terapêuticas; no segundo caso, ao contrário, a proteção é nula ou irregular.

Fazendo um paralelo da ação dos derivados da 4-4'-diamino-difenilsulfona com a dos derivados da 4-nitro-4'-amino-difenilsulfona, parece evidente, no conjunto das provas, uma ação mais eficaz dos primeiros na infecção meningocócica do camundongo.

Analogamente quanto foi observado na terapêutica da infecção toxoplásmica, o formil-derivado parece provido de atividade superior à do acetil-derivado correspondente, que possui um átomo de carbono a mais na cadeia lateral.

O Diasone, derivado aldeidico, possui um valor anti-meningocócico aproximadamente correspondente ao do Formilone, derivado acilico. (Usando grande número de DLM, os resultados irregulares obtidos em repetidas experiências não permitiram concluir si a atividade do Diasone é ou não superior à do Formilone.)

O Diclorone, como salientámos, é um derivado da 4-4'-diamino-difenilsulfona com o radical tricloroacetílico.

Êste radical halogenado, já assinalado por Bergmann e colaboradores (7) como particularmente interessante nas pesquisas sôbre quimioterapia contra germes alcool-ácido resistentes, encontra-se, no Diclorone, junto com um radical sulfônico, o radical mais ativo até agora conhecido na infecção tuberculosa. Como se pode observar, a substituição de três átomos de H do grupo acetílico do Rodilone, por três átomos de Cl, não modificou sensivelmente a atividade anti-meningocócica do produto.

Entre os antibióticos de origem microbiana estudados, a piocianina mostrou-se praticamente inativa na proteção dos camundongos contra a infecção meningocócica, mesmo quando usada em doses bastante elevadas (próximas das doses tóxicas) e repetindo muitas vezes as injeções.

SUMÁRIO

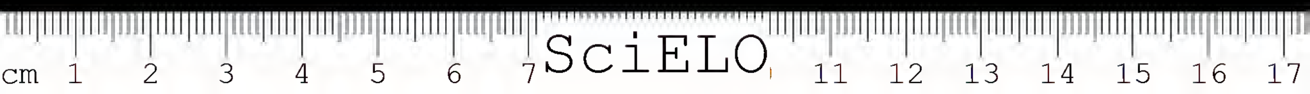
São relatadas pesquisas sôbre a ação protetora de seis derivados da difenilsulfona e de duas substâncias antibióticas de origem microbiana (penicilina e piocianina) na infecção meningocócica experimental do camundongo.

Os resultados das experiências foram demonstrativos somente quando a infecção se fez com um número limitado de D.L.M. (1 - 100). Observou-se, nestas condições, que todos os derivados da difenilsulfona possuem ação protetora anti-meningocócica *in vivo* mais intensa para os derivados da 4-4'-diamino-difenilsulfona do que para os da 4-nitro-4'-amino-difenilsulfona. Dentre os produtos mais ativos, salienta-se o formil-derivado da 4-4'-diamino-difenilsulfona, já assinalado em pesquisas anteriores. O tricloroacetil derivado da mesma série, de particular interêsse em pesquisas de quimioterapia antituberculosa, manifestou também clara ação anti-meningocócica.

A piocianina, substância antibiótica de origem microbiana, resultou inativa, enquanto que a penicilina, confirmando trabalhos precedentes de outros, mostrou acentuado poder anti-meningocócico.

ABSTRACT

The paper deals with the study of the protective value of six diphenylsulfone derivatives and of two antibiotic substances (penicillin and pyocyanin) in meningococcus infection in mice.


cm 1 2 3 4 5 6 7
SciELO
11 12 13 14 15 16 17

VACINAÇÃO T.A.B.

FORMAÇÃO DE AGLUTININA "O" NO HOMEM PELO EMPRÊGO DE VACINA FORMOLADA

POR

L. NOGUEIRA CARRIJO, C. D. AVILA PIRES & CELSO BRANDÃO

(Do Laboratório de Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Em trabalhos anteriores foi estudado o emprêgo das vias subcutânea e intradérmica para a vacinação antitifica, usando-se uma vacina T.A.B., morta pelo formol e adicionada de ácido fênico como preservativo (1 e 2). O resultado obtido foi de todo inesperado, revelando-se o produto incapaz de induzir a formação de aglutinina "O" nos indivíduos vacinados, por qualquer das vias.

Resultados semelhantes, é certo, já haviam sido obtidos anteriormente, com outros tipos de vacina, por diferentes pesquisadores (3 a 8). Entretanto, a sucessão de numerosos trabalhos veio demonstrar, de maneira exaustiva, que as vacinas antitificas podem e devem induzir a formação de aglutinina "O" (9 a 18). Êsses resultados foram ampliados pela experimentação posterior com endotoxóides e vacinas "Vi" (19 a 24).

Outros pesquisadores, que haviam inicialmente tido resultados negativos, obtiveram-nos posteriormente positivos, atribuindo aquêles a deficiências, de diversa natureza, do produto utilizado (25).

A importância do antigeno "O" para a virulência bacteriana, o seu valor como agente imunizante e a conveniência de mantê-lo o mais possivelmente integro, numa vacina antitifica, parecem estar perfeitamente estabelecidos (26 a 30). O seu papel nem mesmo foi diminuido pelos trabalhos mais recentes, de FELIX e PITT (31 e 32), que resultaram na descoberta do antigeno "Vi", principal responsável pela virulência do bacilo tifico. Apenas foi melhor delimitado, ficando evidenciado ser de natureza essencialmente tóxica, representando a endotoxina bacteriana, aliás, fator indispensável da virulência.

Fomos, assim, levados a realizar a presente investigação, visando elucidar a causa da deficiência verificada no produto usado anteriormente (1 e 2). Considerando que os cuidados dispensados ao seu preparo garantem a presença do antígeno, em concentração suficiente, na suspensão bacteriana inicial, a sua ausência, no produto final, seria devida, provàvelmente, à incidência posterior de qualquer causa alterante. Esta poderia ser:

a) uma ação lesiva, desnaturante, do formol usado para matar e desintoxicar as suspensões bacterianas;

b) uma ação semelhante do fenol, empregado como preservativo do produto, ou, finalmente,

c) conseqüência do envelhecimento exagerado da vacina.

A elucidação dêstes itens constitui o objeto da presente comunicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos várias vacinas formoladas, obedecendo todas aos princípios gerais seguidos no preparo do produto utilizado anteriormente (1 e 2). As diferenças necessárias ao nosso experimento resumiram-se à adição ou não de preservativo (fenol a 0.25%) e ao envelhecimento maior ou menor do produto. Foram usadas as seguintes vacinas, todas conservadas a 5°C até o momento do uso:

VACINA I — Formolada, sem preservativo e de preparo recente — 3 mêses;
VACINA II — Formolada, sem preservativo e envelhecida — 18 mêses;
VACINA III — Formolada, fenolada e de preparo recente — 4 mêses, sendo que um mês sem fenol;
VACINA IV — Formolada, fenolada e envelhecida — 19 mêses, sendo seis mêses sem e 13 com fenol;
VACINA V — Formolada, fenolada e envelhecida — 21 mêses, sendo 14 sem e 7 com fenol;
VACINA VI — Morta e preservada pelo sublimado a 1:5.000, segundo BARTOS & BUCHGRABER (33). De preparo recente — 3 mêses e usada como contrôle.

As vacinações foram feitas em 319 indivíduos, em sua quase totalidade detentos recolhidos à Penitenciária do Estado, onde é obrigatória a vacinação T.A.B. (*). Tratava-se de indivíduos em ótimo estado de saúde e nutrição,

---

(*) Agradecemos ao Prof. Flaminio Favero, Diretor da Penitenciária do Estado, todas as facilidades que nos foram concedidas.

2

a maioria dos quais já havia sido vacinada anteriormente, há dois anos ou mais, com vacina formolada-fenolada de outra procedência.

As técnicas utilizadas para o preparo do antigeno (alcoólico) e execução das provas de aglutinação foram as mesmas usadas anteriormente (1 e 2).

A vacinação foi feita pelas vias intradérmica e subcutânea. As doses, sempre intercaladas de uma semana, foram de 0.10 — 0.15 e 0.20 ml no primeiro caso e de 0.5 — 1.0 e 1.5 ml no segundo. A pesquisa de aglutininas foi feita no sôro obtido imediatamente antes da primeira dose e uma semana após a terceira.

RESULTADO E DISCUSSÃO

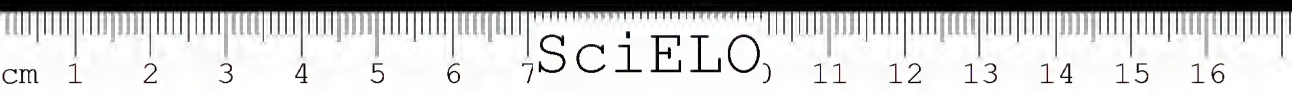
A distribuição percentual do título de aglutinina "O", antes e depois da vacinação, consta do quadro da página seguinte.

A sua simples inspeção basta para dar uma idéia bem nítida da ação lesiva do fenol sôbre o antigeno "O".

Mais demonstrativa, contudo, é a análise do gráfico que representa o título médio de aglutininas. Verifica-se, ao analisá-lo, que a vacina I provocou aumento de 9.4 vezes do título médio de aglutinina "O". Tratava-se de uma vacina formolada, sem preservativo e de preparo recente. A vacina II, também formolada e sem preservativo, porém envelhecida — 18 meses, ainda foi capaz de induzir um aumento de 6.3 vezes do título médio, o que revela uma ação desnaturante quase nula do formol, porquanto a alteração havida pode ser imputada apenas ao envelhecimento.

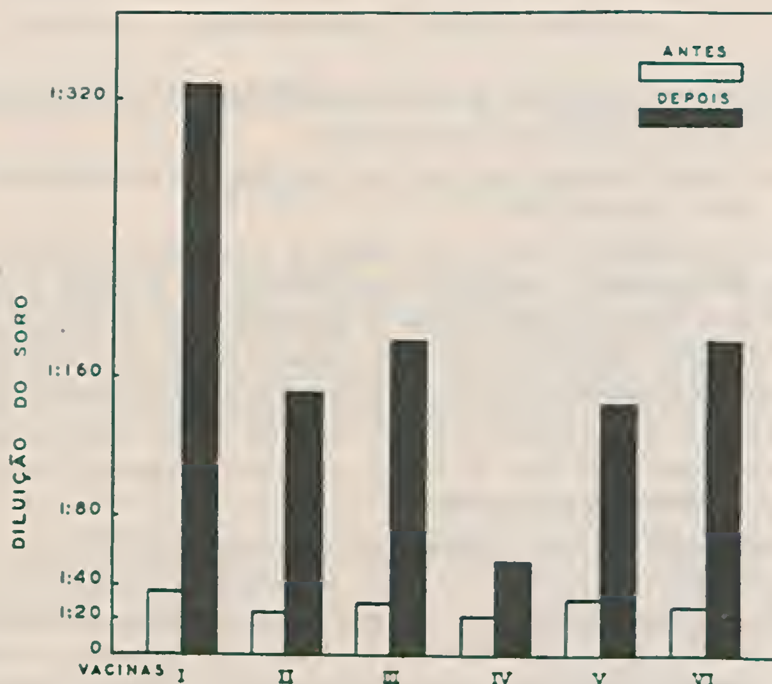
A ação lesiva do fenol começa a ser evidenciada na vacina III. Ainda que o seu preparo seja recente — 4 mêses, foi bastante um contato de 3 mêses com o preservativo para que o seu valor antigênico sofresse uma baixa quase igual à ocasionada pelo envelhecimento de 18 mêses da vacina II: — aumento do título médio de 6.3 vezes nesta e de 6.2 naquela. Mais se evidencia tal ação desnaturante quando o contato do preservativo com o produto é prolongado de muitos mêses. Assim é que na vacina IV, em que o fenol exerceu a sua ação durante 13 mêses, o título médio tornou-se apenas 2.6 vezes mais elevado, enquanto que, na vacina V, onde a sua ação se exerceu sòmente 7 mêzes maior, o título médio aumentou de 4.5 vezes. Não deixa de ser, a seu turno, bem nítido o maior efeito lesivo ocasionado por 7 mêses de contato com o fenol (vacina V) quando comparado com o devido a apenas 3 mêses da ação (vacina III) dêsse preservativo.

Por outro lado, é interessante notar que o sublimado, usado para o preparo e preservação da vacina de contrôle (VI), denotou ser tão lesivo para o



antígeno "O" como o fenol. Realmente, datando o preparo dessa vacina de apenas 3 mêses, o tempo de ação do sublimado, nesse caso, foi igual ao do fenol no caso da vacina III, sendo o aumento do título aglutinante médio — 6.7 vezes, observado em seguida à injeção da primeira, pràticamente o mesmo que o resultante do emprêgo da última, o que revela uma acentuada inferioridade antigênica da vacina contrôle em relação à vacina I. Torna-se interessante salientar êste fato em virtude de ser o sublimado inócuo para o antígeno "Vi" e aconselhado para o preparo dêsse tipo de vacinas (34).

TÍTULO MÉDIO DE AGLUTININA "O" ANTES E DEPOIS DA VACINAÇÃO COM DIFERENTES VACINAS T. A. B.



VACINA I — Formolada, sem preservativo e de preparo recente — 3 mêses
VACINA II — Formolada, sem preservativo e envelhecida — 18 mêses
VACINA III — Formolada, fenolada e de preparo recente. Ação do fenol — 3 mêses
VACINA IV — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 13 mêses
VACINA V — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 7 mêses
VACINA VI — Sublimado. Preparo recente — 3 mêses.

Os nossos resultados, além de confirmarem os de Spassky e Darrenfeld, demonstrando não haver qualquer ação desnaturante do formol sôbre o antígeno "O", ainda ampliam os de Dennis e Berberian (em relação ao sublimado), que constataram a superioridade imunogênica "O" das vacinas formoladas (recentes e sem preservativo), quando comparadas com várias outras (35 e 36).

Resultado comparativo das diferentes vacinas

(Distribuição percentual do título de aglutininas "O")

	Diluição do sôro	VACINA I				VACINA II				VACINA III				VACINA IV				VACINA V				VACINA VI			
		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois		Antes		Depois	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Posit./Neg.	1:20	36	54.6	0	0.6	45	81.8	12	22.0	51	65.4	4	5.1	45	97.9	31	67.3	22	73.3	10	33.3	30	68.2	0	0.0
"	1:40	19	28.8	3	4.5	10	18.2	5	9.0	23	29.5	17	21.8	1	2.1	5	10.8	5	16.6	7	23.3	13	29.5	4	9.0
"	1:80	11	16.6	13	19.7	0	0.0	18	33.0	4	5.1	16	20.5	0	0.0	6	13.0	2	6.6	4	13.3	1	2.2	18	41.0
"	1:160	0	0.0	19	28.8	0	0.0	10	18.0	0	0.0	23	29.5	0	0.0	1	2.1	1	3.3	4	13.3	0	0.0	11	31.0
"	1:320	0	0.0	17	25.7	0	0.0	5	9.0	0	0.0	10	12.8	0	0.0	3	6.5	0	0.0	3	10.00	0	0.0	5	11.3
"	1:640	0	0.0	9	13.6	0	0.0	5	9.0	0	0.0	8	10.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3	0	0.0	2	4.5
"	1:1280	0	0.0	5	75.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3	0	0.0	1	22.2
		66		66		55		55		78		78		46		46		30		30		44		44	

VACINA I — Formolada, sem preservativo e de preparo recente — 3 mêses
VACINA II — Formolada, sem preservativo e envelhecida — 18 mêses
VACINA III — Formolada, fenolada e de preparo recente. Ação do fenol — 3 mêses
VACINA IV — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 13 mêses
VACINA V — Formolada, fenolada e envelhecida. Ação do fenol — 7 mêses
VACINA VI — Sublimado. Preparo recente — 3 mêses.

A ação lesiva do fenol era, de há muito, conhecida (37). Sôbre as vacinas mortas pelo calor o seu poder desnaturante parece ser mais intenso (25). Isto talvez seja devido a uma ação protetora exercida pelo formol. Realmente, o emprêgo dêsse agente parece ocasionar um enrijecimento do corpo bacteriano, tornando-o muito resistente à ação posterior de numerosos agentes lesivos (38).

Aliás, êsse enrijecimento da bactéria, dificultando a sua reabsorção pelo organismo, parece explicar a ação menos tóxica das anavacinas quando inoculadas subcutâneamente. Tal hipótese foi formulada por Pfeifer, segundo relata Pattanée (38). De fato, as endotoxinas das bactérias Gran-negativas, que são de natureza glúcido-lipidica não são desintoxicadas pelo formol, o que chega a constituir, segundo Boivin, um caráter distintivo das mesmas em relação às toxinas verdadeiras, cuja natureza é protéica (39).

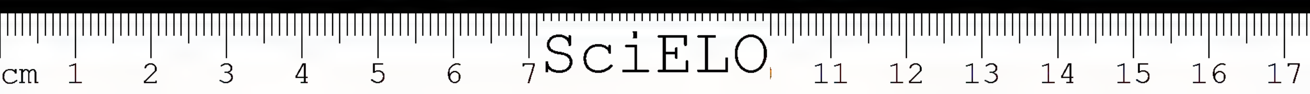
Realmente, usando a via peritoneal para inoculação, em experiências não publicadas, não logramos observar qualquer diminuição da toxidez de uma anavacina tífica, quando comparada à de uma vacina morta pelo calor, proveniente da mesma partida e contendo o mesmo número de germes por ml. A dose mínima mortal foi a mesma ainda depois de 30 dias de desintoxicação a 37°C, tanto para o camondongo como para a cobaia. Tal resultado confirma a sugestão de que a aparente desintoxicação das anavacinas esteja apenas ligada a uma maior dificuldade de reabsorção pelo organismo, quando dada subcutâneamente. O enrijecimento da bactéria se processa ràpidamente, em poucos minutos, dispensando a prolongada desintoxicação a 37°C, de várias semanas, comumente usada, o que favorece um rápido preparo, em benefício de uma estocagem menos prolongada. Aliás, Alivisatos, quem primeiro usou a anavacina tífica em larga escala, prolongava a desintoxicação apenas por 6 horas, neutralizando em seguida o excesso de formol (40).

Finalmente, deve ser salientado o fato de terem sido usadas, concomitantemente, as vias subcutâneas e intradérmica (41), para todas as vacinas experimentadas nêste trabalo.

Nenhuma diferença significativa foi verificada no comportamento das mesmas, do ponto de vista da produção de aglutinina "O" para a *E. typhosa.*

SUMÁRIO

1. O título de aglutinina "O" para o bacilo tífico foi determinado no sôro de 319 detentos da Penitenciária do Estado, antes e depois de vacinados.
2. A vacinação foi feita com seis diferentes vacinas T.A.B., tendo sido usadas as vias subcutânea e intradérmica para todas elas.
3. As vacinas, todas conservadas a 5°C até o momento do uso, foram as seguintes:



a) Duas vacinas formoladas, sendo uma de preparo recente e a outra envelhecida de 18 meses.
b) Três vacinas formoladas e fenoladas, que permaneceram sob a ação do fenol, respectivamente, 3, 7 e 13 mêses.
c) A sexta vacina, morta e preservada pelo $HgCl_2$, usada como contrôle.

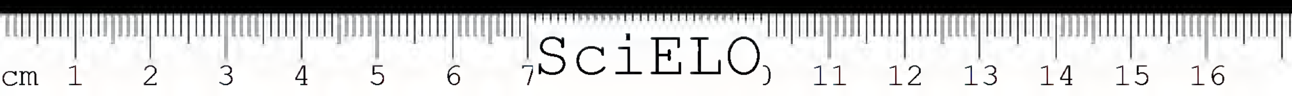
4. Os resultados obtidos indicam que o formol não exerce qualquer ação lesiva sôbre o antígeno "O" do bacilo tífico, pelo menos quanto à sua capacidade de induzir, nos indivíduos vacinados, a produção de aglutininas.
5. A ação desnaturante, levida ao envelhecimento, é muito pequena nas vacinas formoladas não adicionadas do preservativo.
6. O fenol, geralmente empregado como preservativo, é altamente lesivo para o antígeno "O" do bacilo tífico.
7. O sublimado exerce ação tão fortemente lesiva como o fenol.
8. O comportamento das vias subcutânea e intradérmica, quanto à produção de aglutininas, foi idêntico.

ABSTRACT

1. The titer of *E. typhosa* "O" agglutinins has been determined on sera secured from 319 inmates of the state prison, before and after vaccination.
2. Subcutaneous and intradermal vaccination has been carried out with six different T.A.B. vaccines.
3. The vaccines, kept at 5°C until just before use, were the following:

a) two formol "killed" vaccines, one of recent preparation and the other aged for 18 months.
b) three formol "killed" and phenol "preserved" vaccines aged respectively 3, 7 and 13 months.
c) one HgI_2 "killed" and "preserved", used as control

4. The results seem to indicate that the formol does not denatures the *E. typhosa* "O" antigen, at least to the extend so as to interfere with "O" agglutinins production in the vaccinated individuals.
5. Only slight denaturation occurs on aging by formol "killed" vaccines without "preservative".
6. Phenol, generally employed as a "preservative" has a pronounced denaturing action on *E. typhosa* "O" antigen.
7. The action of $HgCl_2$ may be compared with that of phenol.



8. No difference in the effectiveness of agglutinin production could be observed by either route: subcutaneous or intradermally.

BIBLIOGRAFIA

1. *Leme, J. S. M. & Carrijo, L. N.* (1943). Vacinação T.A.B. 1. Formação de aglutininas no homem resultante do emprego de vacina formolada. *Mem. Inst. Butantan,* 17, 111-115.
2. *Leme, J. S. M. & Carrijo, L. N.* (1943). Vacinação T.A.B. 2. Vacina formolada pela via intradermica. *Mem. Inst. Butantan,* 17, 1117-119.
3. *Felix, A.* (1924). The qualitative receptor analysis in its application to typhoid fever. *J. Immunol.,* 9, 115-192.
4. *Felix, A.* (1929). On the non-specific stimulation of agglutinins, with especial reference to the enteric fevers and typhus fever. *J. Hyg., Camb.,* 28, 418-448
5. *Felix, A.* (1930). The qualitative serum diagnosis of enteric fevers. *Lancet,* 1, 505-507.
6. *Stuart, G. & Krikorian, K. S.* (1928). Sorological diagnosis of the enterica by the method of qualitative receptor analysis. *J. Hyg., Camb.,* 28, 105-126.
7. *Pijper, A.* (1930). Serological diagnosis of the enterica. *J. Hyg., Camb.,* 29, 380-393.
8. *Pijper, A. & Dau, H.* (1930). Typhoid agglutination after oral immunization. *Brit. J. exper. Path.,* 11, 112-117.
9. *Gardner, A. D.* (1929). The small-flaking or "O" agglutination of permanent standardised "O" suspensions of *B. typhosus* by the serums of normal, inoculated and infected persons. *J. Hyg., Camb.,* 28, 376-393.
10. *Gardner, A. D.* (1930). The case against the Widal test. *Lancet,* 1, 427.
11. *Mudd, S.* (1932). The agglutinin response to typhoid-paratyphoid vaccination. *J. Immunol.,* 23, 81-90.
12. *Wyllie, J.* (1932). Experiences with small-flaking or granular agglutination in normal, inoculated and enteric fever cases. *J. Hyg., Camb.,* 32, 375-384.
13. *Horgan, E. S.* (1932). Qualitative or quantitative methods in sorological diagnosis of enteric infections? *J. Hyg., Camb.,* 32, 523-528.
14. *Dennis, E. W. & Berberian, D. A.* (1934). A study of the production of somatic and flagellar agglutinis in response to anti-typhoid-paratyphoid inoculation. *Amer. J. Hyg.,* 20, 469-481.
15. *Dulaney, A. D., Wikle, W. T., Stewart, R. L., Rayfield, J. D., Walker, Jr., J. K. & Preacher, A. B.* (1933). H and O agglutination following typhoid vaccination and in an unselected group of individuals. *J. Immunol.,* 24, 229-233.
16. *Dulaney, A. D. & Wikle, W. T.* (1933). H and O agglutination in typhoid fever, other febrile diseases, and in vaccination. *J. Immunol.,* 24, 235-246.
17. *Smith, J.* (1932). Serological diagnosis of typhoid and paratyphoid fevers. *J. Hyg., Camb.,* 32, 143-155.
18. *Giglioli, G.* (1933). Agglutinins found in the serum of subjects inoculated with typhoid-paratyphoid vaccine. *J. Hyg., Camb.,* 33, 387-395.



19. *Grasset, E.* (1939). La vaccination anti-typhoïdique par l'endo-anatoxine typhique. *Pr. méd.*, **47**, 1653-1656.

20. *Grasset, E. & Lewin, W.* (1936). Vaccination antityphique par injection unique d'endo-anatoxine typhique de haut pouvoir antigénique. Etude sérologique comparée avec le mode de vaccination par injections multiples de ce même antigène. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **123**, 682-686.

21. *Grasset, E. & Lewin, W.* (1936). The production and persistence of H and O agglutinins and complement-fixing bodies in persons inoculated with typhoid endotoxoid vaccine. *Brit. J. exper. Path.*, **17**, 179-186.

22. *Leon, A. P., Escarza, F. & Rabasa, E.* (1941). Inmunización activa artificial contra las fiebres tifoidea y paratifoideas A y B, con una sola dosis de vacuna T.A.B. precipitada con alumbre; estudios de la respuesta inmunológica. *Rev. d. Inst. salub. y enferm. trop.*, **2**, 161-186.

23. *Prado, G. E.* (1942). Métodos experimentales de valoración de la imunidad inducida por la vacunación antitifoidea. *Rev. chilena de hig. y med. prev.*, **5**, 189-216.

24. *Felix, A., Rainsford, S. G. & Stokes, E. J.* (1941). Antibody response and systemic reactions after inoculation of new type of T.A.B.C. vaccine. *Brit. med. J.*, **1**, 435-440.

25. *Stuart, G. & Krikorian, K. S.* (1934). Agglutinin response to recent anti-enterica vaccination. *Lancet*, **2**, 644-645.

26. *Topley, W. W. C. & Wilson, G. S.* (1938). *The principles of bacteriology and immunity*, 2nd ed. 1645 pp. *Baltimore, William Wood.*

27. *Arkwright, J. A.* (1927). The value of different kinds of antigen in prophylactic "enteric" vaccines. *J. Path. Bact.*, **30**, 345-364.

28. *Schütze, H.* (1930). The importance of somatic antigen in the production of aertrycke and Gaertner immunity in mice. *Brit. J. exper. Path.*, **11**, 34-42.

29. *Greenwood, M., Topley, W. W. C. & Wilson, J.* (1931). Contributions to the experimental study of epidemiology. The effect of vaccination on herd mortality. *J. Hyg., Cambr.*, **31**, 257-289.

30. *Greenwood, M., Topley, W. W. C. & Wilson, J.* (1931). Contributions to the experimental study of epidemiology. Further observations on the effect of vaccination on herd mortality. *J. Hyg., Cambr.*, **31**, 484-492.

31. *Felix, A. & Pitt, R. M.* (1934). Virulence of *B. typhosus* and resistance to "O" antibody. *J. Path. Bact.*, **38**, 409-420.

32. *Felix, A. & Pitt, R. M.* (1934). A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet*, **2**, 186-191.

33. *Bartos, D. & Buchgraber, J.* (1938). Mit Sublimat hergestellte Typhusvakzine. *Zbl. Bakt.*, **1**, **141**, 355-359.

34. *Bhatnagar, S. S., Speechly, C. G. J. & Singh, M.* (1938). "Vi" variant of *Salmonella typhi* and its application to serology of typhoid fever. *J. Hyg., Cambr.*, **38**, 663-672.

35. *Spassky, N. N. & Danenfeld, L. A.* (1936). Étude expérimentale des propriétés antigènes de l'anavaccin antityphique. *Ann. Inst. Pasteur*, **56**, 76-86.

36. *Dennis, E. W. & Berberian, D. A.* (1934). A study of the production of somatic and flagellar agglutinis in response to antityphoid-paratyphoid inoculation. *Amer. J. Hyg.*, **20**, 469-481.

37. *McCoy, G. W. & Bengtson, I. A.* (1920). Deterioration of typhoid vaccine. *Nat. Inst. Health Bull.*, 122, 7.

38. *Patanè, C.* (1931). Obsrvations sur l'action désintoxicant du formol sur le bacille du typhus. *Boll. d. Soc. ital. di microbiol.*, 3, 678-686.

39. *Boivin, A.* (1938). Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 61, 426-478.

40. *Alivisatos, G. P.* (1925). Ueber einen mit Formol bereiteten Typhusimpfstoff. *Zbl. Bakt.*, 1, 95, 20-30.

41. *Tuft, L.* (1940). Further studies of the intracutaneous method of typhoid vaccination. *Amer. J. med. Sci.*, 199, 84-90.

(Recebido para publicação em dezembro de 1944).



HEMOGLOBINA DOS OFÍDIOS — VALORES NORMAIS E PRESENÇA DE UMA FORMA INATIVA NO SANGUE DA *BOTHROPS JARARACA* (*)

POR

J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

No decurso de experiências sôbre a regulação da glicemia dos ofídios, surgiu a necessidade de saber si o sangue obtido por secção de pequeno segmento da cauda, dada a possível diluição pelo líquido intersticial, teria a sua composição modificada. A determinação da hemoglobina no mesmo animal, em sangue colhido daquela maneira, comparada com determinação em sangue obtido diretamente de um vaso responderia àquela pergunta. Porteriormente, considerando a pobreza da literatura a respeito e o interêsse despertado pelas primeiras determinações, fui levado a estudar melhor o assunto.

No presente trabalho, escolho um método para a determinação da hemoglobina nos ofídios, apresento os resultados obtidos, mostrando, além disso, a existência de uma quantidade apreciável de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) no sangue dêstes vertebrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados exemplares adultos de *Bothrops jararaca* e de *Philodryas* sp., recém-chegados ao serpentário dêste Instituto e ainda não usados até o momento para qualquer outro fim. Sòmente os animais aparentemente em boas condições de saúde foram utilizados.

A colheita do sangue foi feita na cauda ou na aorta abdominal.

a) *Na cauda.* Depois de bem lavada corta-se, com tesoura forte, um segmento da cauda, de 3-4 mm de diâmetro na superfície de corte. Com o animal em posição vertical, cabeça para cima, o sangue goteja fàcilmente. Terminada

---

(*) Êste trabalho foi possibilitado, em parte, graças à benemerência dos drs. A. ALVES FILHO e A. RIBEIRO LIMA, por intermédio dos Fundos Universitários de Pesquisas.

a colheita, inverte-se a posição do animal e estanca-se a hemorragia colocando-se uma gôta de percloreto de ferro mais ou menos a 30 por cento na superfície de corte.

b) *Na aorta.* Fixado o animal numa prancha de cortiça, faz-se uma incisão ventral na união do terço posterior com o terço médio do animal e a aorta, bem isolada, é alçada com um fio de linha e puncionada introduzindo-se a agulha contra a direção da corrente sanguínea. O sangue é colocado em tubos contendo oxalato de potássio na diluição final de 0.2 g por cento.

Foram empregados os seguintes métodos para a determinação da hemoglobina:

1. Hematina ácida; método de COHEN & SMITH (1919).
2. Hematina alcalina; modificação de WU (1922) da hematina ácida de COHEN & SMITH.
3. Capacidade de fixação do oxigênio: VAN SLYKE & STADIE (1921). O nosso aparêlho é agitado a motor e o período de extração dos gases foi sempre de 10 minutos.
4. Determinação do ferro (do sangue ou da hemoglobina). Foi usado o método de PONDER (1942 a), modificação ligeira do WONG original, empregando-se 1 ml de sangue de jararaca ou a quantidade correspondente da hemoglobina pulverizada e sêca. Em determinações anteriores, mesmo com os tempos recomendados por PONDER, obtive alguns filtrados corados e turvos. Êste inconveniente foi afastado após adotar como rotina a técnica de deixar ficar o material de um dia para o outro depois da junção da solução saturada de persulfato de potássio.

ESCOLHA DO MÉTODO

Foi tentado, de início, o método da hematina ácida pela facilidade de execução, mas como a diluição do sangue de cobra em HCl 0.1 N dá sempre uma solução muito turva para a colorimetria, foi abandonado o processo. Entretanto, a alcalinização desta solução ácida, turva, com um décimo do volume de NaOH a 10 por cento, dá uma solução límpida, de tonalidade esverdeada, aparentemente utilizável para a colorimetria. O emprêgo do método da hematina alcalina parecia, pois, satisfatório. Para testar a sua precisão na determinação da hemoglobina do sangue dos ofídios foi feita, preliminarmente, uma série de determinações da hemoglobina, no mesmo sangue, pela capacidade fixadora de oxigênio, tomada como padrão e pelo processo da hematina alcalina (Tabela I). As diferenças, grandes e variáveis, observadas na quase totalidade dos casos e, sobretudo, o fato

dos valores serem quase sempre mais altos com a hematina alcalina, fizeram-me pensar na existência de uma quantidade variável de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) no sangue dêstes ofídios, uma vez que o fato já tinha sido assinalado por Ammundsen (1939, 1941), para o sangue humano normal. Esta possibilidade da presença de hemoglobina inativa afastou, logo de início, o emprêgo da capacidade de oxigênio como método de rotina, ou mesmo como método padrão de comparação.

Tabela I

Hemoglobina do sangue de jararacas. Determinações comparativas pela capacidade de oxigênio e pela hematina alcalina

Caso	Hb g% Capacidade	Hb g% Hematina	Diferença %
1	4.8	5.1	+ 6.2
2	6.6	6.6	0.0
3	[illegible].0	5.1	+ 2.0
4	4.7	5.1	+ 8.5
5	5.1	4.9	— 3.9
6	5.0	5.9	+ 18.0
7	3.8	4.2	+ 10.5
8	4.2	4.2	0.0
9	7.2	7.7	+ 6.9
10	5.7	5.9	+ 3.5
11	5.8	6.3	+ 8.6
12	8.7	9.4	+ 8.0
13	6.0	6.1	+ 1.7
14	6.7	7.0	+ 4.5
15	6.1	6.5	+ 6.6
16	7.6	8.2	+ 7.9
17	4.8	5.7	+ 18.8

O método da hematina alcalina foi, então, comparado com a dosagem do ferro do sangue. A concordância precária entre os dois processos, (Tabela II) tomada naturalmente a dosagem do ferro como a mais precisa, levou-me ao abandono definitivo do método da hematina alcalina. Apesar do elogio ao último método feito recentemente por Clegg & King (1942), observei que na determinação das hemoglobinas da jararaca e do cão (Prado, 1944) os valores encontra-

dos não concordaram com os obtidos pela dosagem do ferro total. Aliás é êste o resultado a que chegou PONDER (1942 b), trabalhando com sangue humano.

TABELA II

Hemoglobina do sangue de jararacas. Determinações comparativas pelo ferro total e pela hematina alcalina

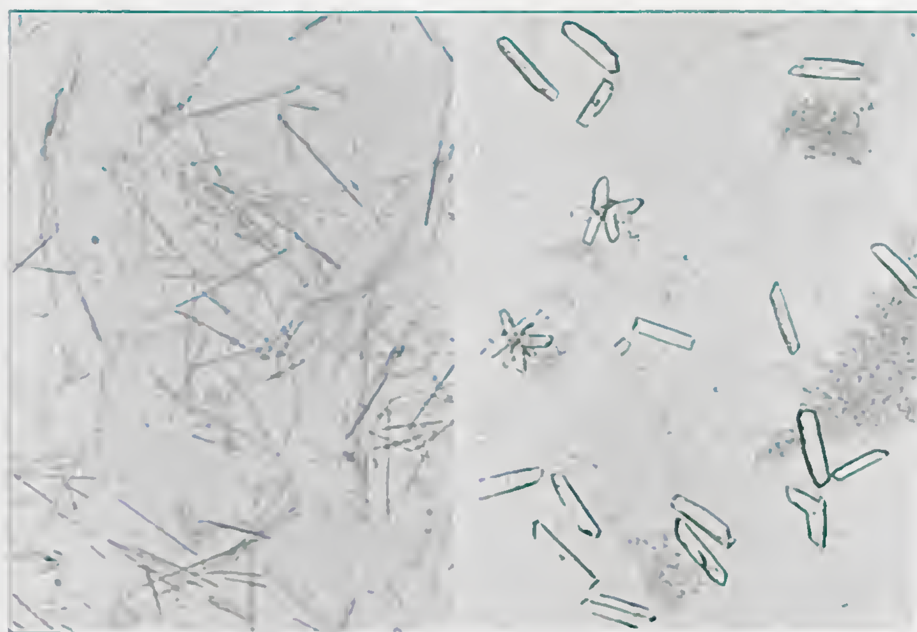
Jararaca N.°	Hb g% Ponder	Hb g% Hem. alcal.	Diferença %
8	6.3	5.3	— 15.9
10	6.6	5.5	— 16.7
11	6.6	5.6	— 15.2
12	6.9	6.9	0.0
23	7.8	6.1	— 21.8
24	7.8	6.8	— 12.8
27	8.1	8.4	+ 3.7
28	8.1	7.0	— 13.6
29	8.1	6.6	— 18.5
33	8.4	7.8	— 7.1
34	8.4	7.1	— 15.5
35	8.4	8.1	— 3.6
36	8.7	8.4	— 3.4
46	9.3	8.6	— 7.5

Diante do exposto, foi escolhido o método de dosagem do ferro total porque me pareceu o único capaz de dar os valores mais precisos no material em estudo. Surgiu, assim, uma última dificuldade; qual a concentração de ferro na hemoglobina da jararaca?

CRISTALIZAÇÃO E PORCENTAGEM DE FERRO NA HEMOGLOBINA DA JARARACA

A transformação das concentrações de ferro total do sangue em mg %, para hemoglobina em gramas por cento, exige que se conheça a porcentagem de ferro na hemoglobina pura. Com esta finalidade, foi tentada a cristalização das hemoglobinas de jararaca e parelheira pelo método de DELORY (1943), usando tolueno como agente hemolisante (HEIDELBERGER, 1922), em substituição ao éter. Em experiências preliminares, êste método permitiu, perfeitamente bem, a cristalização da hemoglobina de cão (microfotografia I). A média das determinações de

ferro em três preparações cristalinas de hemoglobina de cão, reduzidas a pó e sêcas na estufa a 105°C, durante 30 minutos, tratamento êste que não altera a sua composição. (MORRISON & HISEY, 1935), foi de 333 mg%. Com o sangue de parelheiras e jararacas, entretanto, o método de DELORY deixou precipitar muito material amorfo, juntamente com os cristais de hemoglobina (microfotografia II). Repetidas vezes foi tentada a cristalização, variando as concentrações de álcool etílico de 15-35%, mas sempre sem cristalização completa, como no cão. A microfotografia de hemoglobina de jararaca corresponde a uma preparação obtida usando-se álcool na concentração de 16%. Quanto maior a concentração do álcool, maior a quantidade de material amorfo que se precipita. Aparentemente, a hemoglobina dêstes ofídios é de mais difícil cristalização que a do cão mas, diante dos resultados, parece possível a cristalização completa. A tentativa do processo de DELORY em vários pH talvez resolvesse a dificuldade encontrada.



I II

Microfotografia dos cristais de hemoglobina.
I) Sangue de cão. II) Sangue de jararaca.

As determinações de ferro nas preparações impuras de hemoglobina de jararaca variaram em tôrno de 300 mg % e o valor mais alto foi de 306 mg % em uma das preparações. Diante disto e levando em conta que as preparações são, seguramente, impuras, suponho que a porcentagem de ferro na hemoglobina da jararaca deva ser igual, ou muito pouco menor, que a da hemoglobina dos mamíferos.

TABELA III

Concentração de ferro e hemoglobina no sangue de 49 Bothrops jararaca

Jararaca N.º	Pêso g	Sexo	Fe mg %	Hb g %
1	229	♀	15	4.48
2	160	♂	18	5.38
3	370	♀	18	5.38
4	355	♀	20	5.97
5	110	♂	20	5.97
6	115	♂	21	6.27
7	390	♀	21	6.27
8	141	♀	21	6.27
9	125	♂	22	6.57
10	92	♂	22	6.57
11	126	♀	22	6.57
12	215	♀	23	6.87
13	140	♀	23	6.87
14	185	♂	24	7.17
15	170	♀	24	7.17
16	295	♀	25	7.17
17	255	♂	25	7.47
18	490	♀	25	7.47
19	132	♂	25	7.47
20	135	♂	25	7.47
21	213	♀	26	7.77
22	355	♀	26	7.77
23	70	♂	26	7.77
24	150	♀	26	7.77
25	145	♂	27	8.06
26	180	♀	27	8.06
27	285	♀	27	8.06
28	110	♀	27	8.06
29	176	♂	27	8.06
30	183	♂	27	8.06
31	148	♀	28	8.36
32	135	♂	28	8.36
33	268	♀	28	8.36
34	148	♀	28	8.36
35	180	♀	28	8.36
36	160	♀	29	8.66
37	200	♀	30	8.96
38	175	♀	30	8.96
39	273	♀	31	9.26
40	530	♀	31	9.26
41	445	♀	31	9.26
42	144	♀	31	9.26
43	175	♀	31	9.26
44	100	♂	31	9.26
45	80	♂	31	9.26
46	150	♂	31	9.26
47	380	♀	32	9.56
48	118	♂	33	9.86
49	118	♂	33	9.86

30 ♀ e 19 ♂

Médias { Hb 7.80 ± 1.3 g%
Fe 26.1 ± 4.2 mg%

Hall & Gray (1929) fazem a mesma afirmação referindo-se à hemoglobina dos peixes. Na Tabela III, coluna 5, calculei a hemoglobina a partir da concentração de ferro total do sangue, supondo que na jararaca a hemoglobina contenha 335 mg % daquele elemento. Si esta suposição não corresponder à realidade o êrro proveniente dêste cálculo não poderá ser maior do que 10%, pois a hemoglobina dêstes ofídios contém, no mínimo, 306 mg % de ferro.

COMPARAÇÃO DAS DETERMINAÇÕES NA CAUDA E NA VEIA

Em experiências preliminares foi feita uma série de comparações, ainda com o método de hematina alcalina, retirando-se sangue, no mesmo animal, por corte

Tabela IV

Determinações de hemoglobina, nas mesmas jararacas, em sangues de cauda e de veia

Número	Hb g% veia	Hb g% cauda
1	6.2	4.3
2	7.1	3.4
3	6.1	5.6
4	6.3	3.8
5	8.4	6.0
6	6.8	6.2
7	7.8	7.7
8	7.7	6.8
9	6.4	5.8
10	6.0	5.6
11	6.7	5.2
12	4.6	4.8
13	7.2	6.3
14	8.8	7.6
15	7.6	6.0
16	6.2	5.3
17	10.0	9.9
18	4.8	4.4
19	5.5	5.0
20	8.4	6.0
21	8.2	7.1
22	6.2	6.4
23	6.2	5.5
24	6.1	6.8
25	9.1	3.3
Médias	7.0	5.8

da cauda e por punção da veia cava caudal (processo inteiramente semelhante à colheita na aorta). A dosagem de hemoglobina nas duas amostras conduziu aos resultados da Tabela IV. A diluição média de 17 por cento observada em sangue

obtido da cauda tornou obrigatória a colheita em um vaso. A colheita na aorta foi adotada porque permite a retirada de uma quantidade maior de sangue, suficiente para vários exames, o que é mais difícil quando se faz a punção venosa.

CONCENTRAÇÃO NORMAL DE HEMOGLOBINA

Foi determinada a concentração de ferro total do sangue em 49 jararacas adultas, 30 ♀ e 19 ♂. O valor mínimo foi de 15 mg %; o máximo, 33 mg %; a média, 26.1 mg % e o desvio padrão de 4.2 mg %. Os resultados estão na Tabela III, onde se vêm ainda o pêso e o sexo dos animais estudados. Na coluna

TABELA V

Hemoglobina do sangue de jararacas. Determinações comparativas pela capacidade de oxigênio e pelo ferro total. Relações O_2/Fe.

Jararaca N.º	Hb g% Capacidade	Hb g% Ponder	Fe mg %	Capacidade oxigênio	Relação O_2/Fe *
2	4.2	5.4	18	5.6	311
3	3.9	5.4	18	5.2	289
4	5.2	6.0	20	6.9	345
7	4.9	6.3	21	6.6	314
13	5.6	6.9	23	7.5	326
14	6.2	7.2	24	8.3	346
15	6.7	7.2	24	9.0	375
16	6.5	7.5	25	8.7	348
17	5.6	7.5	25	7.5	300
18	6.3	7.5	25	8.4	336
21	6.6	7.8	26	8.9	342
22	5.8	7.8	26	7.8	300
25	7.1	8.1	27	9.5	352
26	7.2	8.1	27	9.7	359
30	6.9	8.1	27	9.2	341
31	6.5	8.4	28	8.7	311
37	7.8	9.0	30	10.3	343
38	7.0	9.0	30	9.4	313
39	7.5	9.3	31	10.1	326
41	8.0	9.3	31	10.7	345
42	7.4	9.3	31	9.9	319
43	8.1	9.3	31	10.9	352
47	7.8	9.6	32	10.4	325

* ml de O_2 combinados com 1 g de Fe da hemoglobina.

5 os valores de ferro foram transformados em gramas por cento de hemoglobina. Encontramos os seguintes valores: mínimo, 4.48; máximo, 9.86; médio, 7.80 com um desvio padrão de 1.3. Não houve diferença significativa ligada ao pêso ou ao sexo do animal.

HEMOGLOBINA INATIVA

Para verificar sua presença no sangue de jararaca foi feita uma série de comparações determinando-se a hemoglobina, nas mesmas amostras de sangue, pelo método de ferro total e pela capacidade de oxigênio. As determinações foram feitas logo depois da colheita do sangue. Com os dados obtidos calculou-se o volume de oxigênio, em ml, que se combina a 1 g de ferro da hemoglobina (Tabela V, coluna 6). A média encontrada, 331 ml de oxigênio, foi bem baixa, indicando uma quantidade média de hemoglobina inativa de 17 por cento. O valor mais baixo, 289 ml de oxigênio e o mais alto, 375, indicam, respectivamente, 28 e 6 por cento de hemoglobina inativa.

COMENTÁRIOS

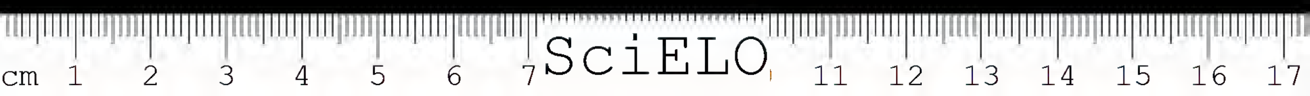
A determinação da hemoglobina no sangue de ofídios pela dosagem de ferro total exige cristalização completa da mesma para verificação da sua concentração percentual precisa de ferro. Além disso, deve estar correta a suposição que o ferro plasmático nestes vertebrados existe em quantidade desprezível em relação ao ferro total, como acontece no homem. Acredito ser êste provàvelmente o caso. De qualquer maneira, fica determinado o ferro total e os valores poderão ser recalculados a qualquer tempo. Na transformação do ferro em hemoglobina preferi usar ainda a antiga constante (335 mg % de ferro), pois não vejo razão suficiente para usar as determinações mais recentes de BERNHART & SKEGGS (1943) para a hemoglobina humana, ou as de MORRISON & HISEY (1935) para a hemoglobina do cão.

Só fiz as determinações em jararacas e em pequeno número de parelheiras. HALL & GRAY (1929), trabalhando com peixes, observaram uma enorme variação no conteúdo de ferro do sangue de espécie para espécie, salientando uma relação direta entre a atividade do peixe e a riqueza hemoglobínica do sangue. Quanto maior a atividade do peixe, maior o teor de hemoglobina. Seria interessante estudar os ofídios sob o mesmo aspecto. As determinações de hemoglobina no sangue de parelheiras, embora em pequeno número, não figurando porisso no presente trabalho, indicam que nestes vertebrados não parece haver diferenças significativas nos resultados obtidos em exemplares de duas famílias tão distintas — as crotalídeas (jararacas) e as colubrídeas (parelheiras). Numa espécie única os valores de HALL & GRAY são bem constantes. Nas jararacas encontrei uma variação bem apreciável no teor de ferro total do sangue. Entretanto, não acredito ter usado exemplares anêmicos porque 26 dêles serviram também para a determinação dos respectivos índices de WINTROBE (VALLE & PRADO, 1944) e como a concentração média da hemoglobina corpuscular foi de 37%, fica afastada aquela possibilidade.

Há muito tempo se sabe que 1 grama de ferro da hemoglobina se combina a mais ou menos 400 ml de oxigênio. Mais recentemente (MARENZI & LIDA, 1938; WEISE. 1937) êste valor tem sido recalculado e verificado ser aproximadamente exato. A concordância entre métodos por dosagem de ferro total com métodos por capacidade de oxigênio ou monóxido de carbono era tida mesmo como fato assentado até que AMMUNDSEN (1939), confirmando, aliás, suspeitas anteriores, fez a verificação contrária, determinando, posteriormente, a quantidade de hemoglobina inativa existente no sangue humano normal (AMMUNDSEN, 1941). Esta hemoglobina inativa, cuja natureza química ainda está por determianr, variou de 2-12% em relação à hemoglobina total e esteve presente em 40% das amostras de sangue estudadas. AMMUNDSEN supõe que a hemoglobina inativa seja metahemoglobina ou, talvez, hematina. Nas determinações em jararacas, a grande discordância entre os valores obtidos pelo método do ferro total e pelo processo da capacidade fixadora do oxigênio é explicável, a meu ver, pela presença no sangue dêstes vertebrados de regular quantidade de hemoglobina inativa. Interessante que o fenômeno foi verificado na totalidade dos vinte e três casos estudados sob êste aspecto e a quantidade média de hemoglobina inativa é muito maior do que a encontrada por AMMUNDSEN no homem normal. Embora seja possível encontrar outros vertebrados com maior teor de hemoglobina inativa do que o registrado agora para os ofídios, o aproveitamento dêste dado para a análise mais acurada do fato poderá conduzir a melhor compreensão do significado fisiológico da chamada hemoglobina inativa

CONCLUSÕES

1. O sangue colhido por secção de pequeno segmento da cauda de jararacas ficou diluido em média de 17% em relação ao sangue venoso.
2. Dos métodos estudados, sómente a dosagem de ferro total do sangue permitiu a determinação precisa da hemoglobina dos ofídios.
3. A concentração média normal do ferro do sangue de 49 jararacas, 30 ♀ e 19 ♂, foi de 26.6 ± 4.2 mg %.
4. A concentração de ferro da hemoglobina da *Bothrops jararaca* é igual ou pouco menor do que a dos mamíferos. Usando como fator da transformação 0.335 g % de ferro, a concentração média normal da hemoglobina do sangue foi de 7.80 ± 1.3 g %.
5. Foi encontrada uma forma de hemoglobina inativa, isto é, não combinável ao oxigênio, na totalidade de vinte e três casos estudados. A concentração média da hemoglobina inativa foi de 17% da hemoglobina total.
6. O pêso ou o sexo do animal não influenciaram significativamente a concentração do ferro total do sangue da jararaca.



RESUMO

O teor de homoglobina do sangue de ofidios foi determinado em parelheiras e jararacas pelos métodos da hematina ácida, da hematina alcalina, pela capacidade fixadora do oxigênio e pela dosagem do ferro total. Sòmente o método do ferro total deu resultados precisos.

A cristalização da hemoglobina dêstes ofidios foi tentada pelo processo de DELORY, que, em minhas mãos, produziu cristalização completa da hemoglobina do sangue de cão. Nos ofidios, a cristalização foi parcial e o teor em ferro da hemoglobina assim obtida variou em tôrno de 300 mg % enquanto que na do cão foi, em média, de 333 mg %. Tomando a porcentagem média de ferro da hemoglobina dos ofidios como sendo a mesma da hemoglobina dos mamíferos e usando o fator de transformação 0.335 g %, a concentração média normal de hemoglobina no sangue da jararaca foi de 7.80 ± 1.3 g %. A concentração média normal de ferro no sangue foi de 26.1 ± 4.2 mg %.

Em todos os casos estudados foi achada uma proporção de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) em tôrno de 17% da hemoglobina total, cujo significado nestes vertebrados, assim como no homem onde ela aparece em 40% dos sangues estudados, na proporção de 2 a 12%, não está ainda esclarecido.

Pelos resultados das determinações de hemoglobina foi observado que o sangue dos ofídios, obtidos por secção da cauda, se apresentou diluido em média de 17% em relação ao sangue obtido por punção venosa.

Foi ainda verificado que o pêso e o sexo dos animais empregados não modificaram significativamente a concentração do ferro total do sangue da jararaca.

ABSTRACT

1. Hemoglobin determinations were made in blood of snakes by four usual methods: acid and alkali hematin, oxygen capacity and a modification of the original Wong's method. Only the iron method could be used accurately. The normal total blood iron concentration of 49 *Bothrops jararaca* (19 ♂ and 30 ♀) was 26.1 ± 4.2 mg%. This value was not influenced by the sex or the body weight.
2. The crystallization of ophidic hemoglobin was tried with the method of Delory and successfully used with dog's blood. Partial crystallization was obtained with an iron content averaging 300 mg%.
3. Assuming the iron concentration of snake's hemoglobin to be the same as in mammals, i.e. 0.335 g %, the normal blood hemoglobin concentration of *B. jararaca* was 7.80 ± 1.3 g %.

4. Within a group of 23 *B. jararaca* the blood samples analysed have shown in all cases an average of 17% of inactive hemoglobin (non-oxygen-combining form).
5. Blood collected by cutting a little segment of the tail of snakes could not be used for hemoglobin estimation in virtue of a mean dilution of 17% compared with venous blood.

BIBLIOGRAFIA

Ammundsen, E. (1939). The presence of non-oxygen-combining (inactive) hemoglobin in the blood of normal individuals. *Science*, **90**, 372-373.

Ammundsen, E. (1941). Studies on the presence of non-carbon monoxide combining (inactive) hemoglobin in the blood of normal persons. *J. biol. Chem.*, **138**, 563-570.

Bernhart, F. W. & Skeggs, L. (1943). The iron content of human hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **147**, 19-22.

Clegg, J. W. & King, E. J. (1942). Determination of hemoglobin by the alkaline hematin method. *Brit. Med. J.*, **2**, 329-333.

Cohen & Smith. (1919). J. biol. Chem., **39**, 489: modificado por *B. L. Oser;* citado em *Hawk, P. B. & Bergeim, O.* (1937). Practical Physiological Chemistry, 11th ed., 968 pags., Blakiston, Philadelphia.

Delory, G. E. (1943). The preparation and analysis for iron of haemin and hemoglobin. *The Analyst*, **68**, 5-8.

Hall, F. G. & Gray, I. E. (1929). The hemoglobin concentration of the blood of marine fishes. *J. biol. Chem.*, **81**, 589-594.

Heidelberger, M. (1922). A method for the preparation of crystalline hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **53**, 31-40.

Marenzi, A. D. & Lida, E. (1938). Estúdio comparativo de los métodos de determinación de la hemoglobina. *Rev. Soc. Arg. Biol*, **14**, 339-346.

Morrison, D. B. & Hisey, A. (1935). The carbon monoxide capacity, iron and the total nitrogen of dog hemoglobin. *J. biol. Chm.*, **109**, 233-240.

Ponder, E. (1942 a). The relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration. *J. biol. Chem.*, **144**, 333-338.

Ponder, E. (1942 b). Errors affecting the acid and the alkali hematin methods of determining hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **144**, 339-342.

Prado, L. (1944). A ser publicado.

Valle, J. R. & Prado, L. (1944). Nota sôbre a hematologia dos ofídios. Índices de Wintrobe da *Bothrops jararaca*. *Mem. Inst. Butantan.*

Van Slyke, D. D. & Stadie, W. C. (1921). Citados em *Hawk, P. B. & Bergeim, O.* (1937). Practical Physiological Chemistry, 11th ed., 968 pags., Blakiston, Philadelphia.

Wu, H. (1922). Studies on hemoglobin. I. The advantage of alkaline solutions for colorimetric methods for the determination of hemoglobin. *J. Biochem.* (Japan) **2**, 173. Citado em *Peters, J. P. & Van Slyke, D. D.* (1931). Quantitative Clinical Chemistry, 1.ª ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Weise, W. (1937). Vergleichende Untersuchungen zur Methodik der Hämoglobinbestimmung im Blute. *Biochem. Z.*, **293**, 64-93.

(Recebido para publicação em dezembro de 1944).

DISCUSSÃO EM TÔRNO DOS GÊNEROS *OCHETOSOMA* BRAUN, 1901, E *RENIFER* PRATT, 1902 *(TREMATODA)*

POR

ARISTOTERIS T. LEÃO

(Do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Neste trabalho procuramos apresentar argumentos em favor do gênero *Ochetosoma*, cuja validez tem sido posta em dúvida sob a alegação de ter sido insuficientemente descrito e figurado.

Braun, 1901, descreveu sob o nome de *Ochetosoma mostruosum* um novo gênero e espécie de trematóide por êle achado no frasco No. 605 do Museu de Viena, que afirma ter sido encontrado no esôfago de *Corone venustissima*, não apresentando figura do material em sua lacônica descrição.

Braun, 1902, num substancioso trabalho sôbre trematóides de aves, volta ao assunto, propondo diagnose genérica e reproduzindo, em boa figura, o material por êle descrito em 1901. A diagnose genérica então proposta foi a seguinte:

> "Körper unter mittelgross, ganz abgeplattet kann rinnenförming Gekrümmt werden; bestachelt. Saugnäpfe gross, Pharynx klein, *Oesophagus* wenig länger, Darmschenkel kurz, den Bauchnapf nicht überschreitend; *Genitalporus* ventral, jedoch in derNähe eines Seitenrandes, Zwischen den Saugnäpfen; Cirrusbeutel langgestreckt kräftig, mit *vesicula seminalis*, *cirrus* dick, unbewaffnet;
>
> Hoden symmetrisch hinter dem Bauchnapf; Keimostock assymmetrisch vor einem Hoden; Dotterstöcke schwach entwickelt, nicht baumenförming, zu den Seiten des Bauchnapies und hinter diesen. Uterus mit ab-und aufsteigendem Schenkel und quer gerichteten, das Mittelfeld nicht überschreitenden Schleigen, vorzugsweise in der hinteren Korperhälfte sich ausbreitend. Eier dünneschalig klein. Im Rachen von Vögeln".

Comentando as possíveis relações do helminto diz:

> Dieser Art nähert sich das die Lunge von *Heterodon platyrhinus* bewohnende *Distomum zschokkei* VOLZ, 1899, und eine zweite, in

Xenodon sp. gefundene, noch unbennante Art, die ich aus einer mir von Herrn Dr. Brande-Halle übersandten Zeichnung kenne. Es scheint mir jedoch fraglich, ob man diese beiden Arten in dia Gattung *Ochetosoma* stellen kann."

Pratt, 1902, trabalhando com trematóides parasitos de répteis, descreveu um novo gênero e espécie, que denominou *Renifer ellipticus*, considerando-o também muito próximo de *Distomum zschokkei*. Não cita, porém, na bibliografia, o trabalho de Braun, 1901, o que demonstra não o ter consultado. A diagnose genérica apresentada por Pratt foi a seguinte:

"Small distomes with body more or less elliptical and covered with minute spines or scales. Mouth subterminal; acetabulum somewhat larger than oral sucker and in anterior half of body. Pharynx present; Oesophagus short or wanting; intestinal caeca reach about to the middle of the body or a little past it.

Excretory vesicle very large, shaped, extending into the forward end of the body. Genital pore in front of the acetabulum often to the left or right of the median line. Testes two. usually lobate, in the same transverse plane near middle of the body; cirrus sac often long, containing a vesicula seminalis which bends on itself. Ovary just posterior to the acetabulum and in front of the testes; yolk-glands lateral in position and occupyng the middle third of the body; Laurer's canal present; uterus composed of a descending and ascending limb, and extending to the hinder end of the body; receptaculum seminis absent or minute. Parasitic in the mouth or air passage of snakes and in the intestine of turile".

Nicoll, 1911, descreveu, de *Leptodira annulata*, a segunda espécie do gênero de Braun, *Ochetosoma formosum*.

Talbot, 1934, transferiu a espécie de Nicoll para o gênero *Renifer* dizendo:

"*Ochetosoma formosum* Nicoll, 1911, is placed in the genus *Renifer*, because in this species the intestinal caeca extend beyond the acetabulum".

No entanto, si compararmos as figuras de Braun, Pratt e Nicoll, não encontraremos diferenças que justifiquem tal procedimento. Ainda no mesmo trabalho diz:

"Five genera: *Styphlodora* Looss, 1899; *Astiotrema* Looss, 1900; *Ochetosoma* Braun, 1902; *Oistosomum* Odhner, 1902, and

Mediorima Nicoll, 1911, formerly included in the *Reniferinae* have been excluded by the present subfamily diagnosis..... The genus *Ochetosoma* is not included because it has been insuficiently described and no figure of the type species is available".

Não são, entretanto, verdadeiras as afirmações de Talbot, pois si Braun não apresentou diagnose genérica e figura do material resumidamente por êle descrito em 1901, esta falta foi compensada no seu segundo trabalho, 1902, onde são apresentadas duas figuras do verme total e diagnose genérica.

Mehra, 1937, à pág. 457, diz:

"*Ochetosoma monstruosum* Braun, 1901, should not be considered as separate from *Renifer*. In the former the intestinal caeca do not extend behind the acetabulum as mentioned by Braun, but from the figure of *Ochetosoma monstruosum* it is clear that they extend a little behind the posterior margin of the acetabulum as in *Renifer*. It, therefore, appears, that there is hardly any difference between these two genera".

Mehra não inclui, porém, o gênero *Ochetosoma* na chave dos *Reniferinae*, que então apresentou, o que indica não o ter reconhecido como gênero dos *Reniferinae*.

Byrd e Denton, 1938, discutem a sistemática dos *Reniferinae* e, em relação ao gênero *Ochetosoma*, dizem:

"In the present diagnosis of the subfamily *Reniferinae* we agree with Talbot, 1934, in excluding the genera *Styphlodora* Looss, 1902, *Astiotrema* Looss, 1900, *Ochetosoma* Braun, 1902, and *Oistosomum* Odhner, 1902, for reasons stated by Talbot".

O hospedador de *Ochetosoma monstruosum* Braun, 1901, citado nos trabalhos de Braun é *Corone venustissima*, o qual o referido autor afirma ser uma ave.

Hughes, Higginbotham e Clary, 1942, citam, entretanto:

"*Ochetosoma monstruosum*, Braun, 1901.
From *Erythrolamprus venustissima*".

Procurando esclarecer esta divergência, pedimos, por carta, a opinião de especialista do Dr. Oliverio Pinto, ornitologista e diretor do Departamento de Zoologia do Estado de São Paulo, cuja resposta foi a seguinte:

"... Estudando o caso nela ventilado, parece-me fora de dúvida que só por engano teria Braun se referido a *Corone venustissima*, querendo escrever *Coronella venustissima*, nome usado por Schlegel para a conhecida cobra descrita pelo príncipe Maximiliano, com o nome de *Coluber venustissimus*. Trata-se, no fim de contas, de mero sinônimo de *Erythrolamprus aesculapii*, como fazem supôr as citações de sua própria carta. *Corone* é gênero exclusivamente de ave, subordinado à família *Corvidae*...".

Por outro lado pedimos também esclarecimentos ao Dr. Alcides Prado, herpetologista do Instituto Butantan, o qual nos disse:

"*Erythrolamprus venustissimus* Neuwied foi, por Boulenger, considerado sinônimo de *Erythrolamprus aesculapii* (L.), que habita a América tropical, com o que estou de acôrdo".

Temos, portanto, razões para acreditar que o material de Braun provinha, com tôda probabilidade, do esôfago de *Erythrolamprus aesculapii* (L.) (— *E. venustissimus* Neuwied), serpente muito comum nas Américas do Sul e Central, e não de uma ave. Ora, sendo *Corone* gênero de *Corvidae*, não existente nas Américas, mais uma razão, portanto, em apôio às nossas considerações.

Parece, portanto, ter havido engano ao ser rotulado o material encontrado no frasco No. 605 do Museu de Viena, na qual, em lugar de escreverem *Coronella venustissima*, grafaram erradamente *Corone venustissima*.

Apesar de terem aparecido numerosos trabalhos sôbre trematóides de aves desde a ereção do gênero *Ochetosoma*, nunca foi a sua presença assinalada na referida classe, ao passo que em serpentes a presença de representantes do gênero *Renifer* tem sido registrada com freqüência desde a sua descrição em 1902, o que vem em apôio ao nosso ponto de vista.

Talbot, 1934, bem como Byrd e Denton, 1938, citam *Ochetosoma monstruosum* Braun, 1902, o que não nos parece exato, pois o trabalho, no qual foi feita a descrição original, foi publicado em 1901. Por outro lado, a data de *Renifer* Pratt é por alguns autores citada como 1902 e por outros 1903.

No Zoological Record (volume de 1904) é citado 1903, porém, Pratt (Synopses of North American Invertebrates) cita 1902. De qualquer forma o gênero de Braun é anterior, pois traz a data de abril de 1901.

Morfològicamente, os gêneros de Braun e Pratt aqui tratados são indistinguíveis, apresentando apenas diversidade de hospedadores, a qual, pelas considerações expostas neste trabalho, não tem razão de ser. Achamos, porisso, lógico concluir pela prioridade de *Ochetosoma* Braun, 1901, sôbre *Renifer* Pratt, 1902.

Por outro lado, sendo *Renifer* sinônimo de *Ochetosoma*, cessarão também as razões de existência de *Reniferidae* e *Reniferinae* e lógico será criar novos nomes de família e subfamília para substituir aquêles julgados inaproveitáveis à luz das regras internacionais de nomenclatura zoológica.

Ochetosomatidae, n. n.

Com os caracteres dados por BAER, 1924, e refundidos por MCMULLEN 1937, para a família *Reniferidae* e que reproduzimos na íntegra:

> "*Plagiorchiodea*: Excretory bladder in larval and adult forms Y-shaped with main excretory tubes attached laterally and posterior to tips of arms. *Cercariae* with small stylets and 8-10 pairs of stylets glands. Body of adults elongate, may or may not be spined. Extent of intestinal ceca variable. Genital pore preacetabular, median or lateral. Cirrus well developed. Position of gonads variable. Vitellaria follicular and variable in extent. Uterus extends into posterior end. Adults parasitic in the digestive and respiratory tracts of reptiles".

Gênero tipo: *Ochetosoma* BRAUN, 1901.

Ochetosomatinae, n. n.

Com os caracteres dados por BYRD e DENTON, 1938, para a subfamília *Reniferinae* e que reproduzimos integralmente:

> *Ochetosomatidae*: "Distomates trematodes with elongated oval bodies and rounded ends, with or without spines. Prepharynx usually present. Esophagus and pharynx usually with gland cells. Ceca variable en length, reaching to ot beyond center of body. Ovary behind acetabulum, smooth or lobed in outline. Laurer's canal present. Receptaculum seminis absent. Uterus descending and ascending between testes, descending to posterior end of body. Metraterm present, variable in lengrh and degree of development. Vitellaria follicular, follicles distintct or dentritic, usually lateral do ceca in ventral third of body except in *Natriodera*. Genital pore in front of acetabulum, median or lateral. Testes smooth to lobate, opposite or oblique, behind ovary. Cirrus sac well developed, rarely extending posterior to ventral sucker. Excretory vesicle Y-shaped, cornua in adults encircling acetabulum except in *Natriodera*. Flame cell pattern of 2 x 6 x 3 type. Larval stages remarkably uniform, eggs fully embryonated when oviposited; miracidia with two large penetration

glands, without eye-spots; sporocysts simple; xiphidiocercariae with small stylet, 8-10 pairs of penetration glands and Y-shaped excretory vesicle with cornua encircling acetabulum; adolescarieae using various species of tadpoles as intermediate hosts. Parasitic in Reptilia".

Gênero tipo: *Ochetosoma* BRAUN, 1901.

Gênero *Ochetosoma* BRAUN, 1901.

Com os caracteres dados por PRATT, 1902, e refundidos por BYRD e DENTON, 1938, para o gênero *Renifer* e que reproduzimos:

> *Ochetosomatinae*: With the characteres of the subfamily. Ceca variable in lengthh, may or may not be directed toward center of body between testes. Genital pore lateral outside area between bifurcation of caeca and acetabulum, on level with bifurcation of ceca. Metraterm variable, usually well developed and muscular, usually pulled away from cirrus sac. Cirrus sac muscular, not extending posterior to acetabulum. Parasitic in upper digestive tract of snakes".

Espécie tipo: *Ochetosoma monstruosum* BRAUN, 1901.

Não discutiremos, neste trabalho, o valor dos diversos gêneros e espécies incluidos na família *Ochetosomatidae*, bem como a divisão desta em subfamílias, pois pretendemos tratar o assunto em conjunto em uma publicação futura.

RESUMO

Neste trabalho é feito um estudo bibliográfico sôbre os gêneros *Ochetosoma* BRAUN, 1901, e *Renifer* PRATT, 1902. A diversidade de hospedadores é discutida, concluindo-se pela sua inexistência. Não sendo encontrados elementos diferenciais, que justifiquem a separação dos dois gêneros e tendo *Ochetosoma* BRAUN, 1901, prioridade sôbre *Renifer* PRATT, 1902, o último é considerado sinônimo do primeiro. *Reniferidae* e *Reniferinae* passam a denominar-se respectivamente *Ochetosomatidae*, n. nom., e *Ochetosomatinae*, n. nom.

ABSTRACT

1 — The genera *Ochetosoma* BRAUN, 1901, and *Renifer* PRATT, 1902, have been revised.

2 — The question of different hosts has been considered and the conclusion of its non-existence is reached.

3 — No differentiating elements have been found that justify the separation of the genera.

4 — *Renifer* Pratt, 1902, shall be considered synonimous of *Ochetosoma* Braun, 1901, on account of the earlier description of the last one.

5 — *Reniferidae* and *Reniferinae* become therefore respectively *Ochetosomatidae*, n. nom., and *Ochetosomatidae*, n. nom.

Cumpre-nos deixar aqui consignados os nossos agradecimentos a todos aquêles que, direta ou indiretamente nos tem prestigiado na consecução dos nossos trabalhos, lembrando, especialmente, os nomes dos Profs. Drs. Lauro Travassos, Paulo de Toledo Artigas e Flavio da Fonseca.

BIBLIOGRAFIA

Braun, M. (1901). *Zbl. Bakt.*, I, 29, 941.

Braun, M. (1902). *Zool. Jahrb. Syst.*, 16, 1.

Pratt, H. S. (1902). *Mark Anniv. Vol.*, 23.

Pratt, H. S. (1902). *Amer. Nat.*, 36, 887.

Pratt, H. S. (1902). *Amer. Nat.*, 36, 953.

Nicoll, W. (1911). *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 677.

Talbot, S. B. (1934). A description of four new Trematodes of the subfamily Reniferinae with discussion of the systematics of the subfamily. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 53, 40-56.

Mehra, H. R. (1937). *Z. Parasitenk.*, 9, 429.

Byrd, E. E. & Denton, J. F. (1938). New Trematodes of the subfamily *Reniferinae*, with a discussion of the systematics of the genera and species assigned to the subfamily group. *J. Parasit.*, 24, 379-399.

Hughes, R. C., Higginbotham, J. W. (1942). The Trematodes of Reptiles, Part 1, Systematic Section. *Amer. Midl. Nat.*, 27, 109-134.

McMullen, D. B. (1937). A discussion of the taxonomy of the family *Plagiorchidae* Lühe, 1901, and related Trematodes. *J. Parasit.*, 23, 244-258.

Volz, W. (1899). *Arch. f. Naturg.*, 65, 231.

(Entregue para publicação em dezembro de 1944).



Ochetosoma monstruosum BRAUN, 1901 (Segundo Braun, 1902).



Renifer ellipticus PRATT, 1902 (Segundo uma reprodução de Talbot, 1934).



Ochetosoma formosum NICOLL, 1911 (Segundo Nicoll, 1911).





Distomum zschokkei VOLZ, 1899 (segundo Volz, 1899).

CITOLOGIA VAGINAL E SEU EMPRÊGO EM GINECOLOGIA ENDÓCRINA (*)

POR

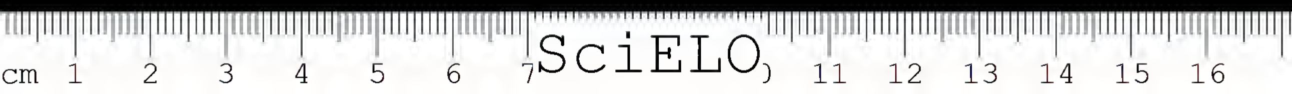
ALVARO MARCONDES SILVA

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

O exame do conteúdo vaginal como processo de investigação da atividade ovariana foi praticamente introduzido em 1917 por STOCKARD & PAPANICOLAOU (1), ao demonstrarem pela primeira vez que era possivel determinar a época do estro na cobaia mediante o exame citológico de esfregaços vaginais. As variações que apresentam as células, nas diversas fases do ciclo estral, são tão nítidas nos roedores que permitiram a ALLEN & DOISY (2), alguns anos mais tarde, crear o seu já clássico teste para pesquisa de estrógenos, baseado nas modificações induzidas por tais substâncias na citologia vaginal de camundongas e ratas castradas.

Variações periódicas do conteúdo celular da vagina foram posteriormente comprovadas em outras espécies superiores, inclusive na humana, mas não com a mesma nitidez que a observada nos roedores. Em relação à espécie humana, nem todos os autores concordam com a existência de um paralelismo entre essas variações e a atividade cíclica do ovário, isto é, o ciclo menstrual, embora não se negue a existência de diferenças entre a citologia vaginal da infância e da menopausa e a da mulher adulta em plena atividade ovariana. DI PAOLA (3) que é um dos que negam o paralelismo acima citado, sugere ter o epitélio vaginal um limiar de resposta baixo em relação aos estrógenos, o qual, uma vez atingido, não lhe permite mais apresentar modificações em relação às pequenas variações na concentração de estrógenos da mulher adulta. Todavia, desde que PAPANICOLAOU (4) publicou o seu exaustivo estudo afirmando de modo convincente que as modificações periódicas encontradas na citologia vaginal humana estão diretamente relacionadas à atividade ovariana, muitos foram os autores que o apoiaram nessa afirmação, aduzindo muitas e muitas provas que não poderiam ser desprezadas. Entre êstes se destaca RUBENSTEIN (22, 7, 23, 24).

(*) Trabalho apresentado em 9 de fevereiro de 1944 à Seção de Ginecologia e Obstetrícia da Associação Paulista de Medicina.



No presente trabalho são referidos os resultados do exame citológico vaginal num grupo selecionado de casos, durante o ano de 1943, no Serviço Clínico da Seção de Endocrinologia do Instituto Butantan, confrontando-os com os achados de outros autores, afim de julgar do valor do método como meio de avaliação da atividade ovariana.

MÉTODOS

A colheita de material tem sido feita de modo um tanto diverso pelos diferentes pesquisadores.

Papanicolaou (4), em 1933, preconizou o uso de uma pipeta de vidro curva numa extremidade e provida de uma pera de borracha na outra. A técnica consistia em comprimir a pera, introduzir a porção curva da pipeta na vagina e, então, por aspiração, colher o material e depositá-lo numa lâmina, fixando-o imediatamente. Êsse é o processo adotado pela maioria dos autores, inclusive por Shorr, cujo método de coloração adotamos.

Salmon, Walter & Geist (5) adotaram um processo diferente. As pacientes eram instruidas para fazer uma lavagem vaginal com água na tarde em que iam se submeter a exame. Êste era feito, introduzindo um espéculo na vagina e limpando bem a cervice e os fundos de saco vaginais para, em seguida, ao retirar o instrumento, arrastar com a sua valva posterior o flúido da parede vaginal anterior. O flúido vaginal presente na valva posterior do espéculo era então diluido em uma porção igual de sôro fisiológico e espalhado numa lâmina, que se deixava secar ao ar para fixar.

Geist & Salmon (6), em outro método, introduziam prèviamente o espéculo na vagina, com o fim de observar a presença ou não de infecção e, por meio de uma pipeta de vidro, aspiravam uma pequena quantidade do flúido vaginal existente na superfície da sua valva posterior.

Rubenstein (7) aconselha o emprêgo de uma alça para a colheita do material, que é feita raspando-se brandamente a parede do fornix posterior da vagina, após a introdução prévia de um espéculo.

Di Paola (3) utilizava a mesma técnica de Papanicolaou, apenas introduzindo a pipeta de vidro já com algumas gôtas de sôro fisiológico no seu interior, que eram expelidas dentro da vagina, de modo a fazer com que o flúido vaginal, então diluido no sôro fisiológico, entrasse espontâneamente na pipeta pelo vasio estabelecido.

Fournier, Manaro & Blanco (8), após experimentarem várias técnicas de colheita, deram preferência a uma pipeta de vidro ligada a um tubo de borra-

cha, que por sua vez era ligado a um pequeno tubo de vidro que servia de peça bucal, e dessa forma faziam a aspiração por sucção, argumentando que a vantagem de tal processo era a de se poder graduar a aspiração à vontade. Nos casos de material escasso procediam como Di Paola, isto é, introduziam a pipeta já com 0.3 cm³ de sôro fisiológico no seu interior e expeliam o líquido na luz vaginal para, em seguida, fazer a aspiração.

Mack (9) aconselha introduzir na vagina um bastão de vidro com a ponta envolvida em algodão, fazendo um leve movimento de rotação, cêrca de uma volta completa, contra as paredes vaginais e, em seguida, colocar a extremidade envolta em algodão dêsse bastão sôbre uma lâmina bem limpa e imprimir-lhe um movimento de rotação, evitando a fricção, de modo a produzir um esfregaço fino, com um mínimo de pregueamento e destorção celular.

Depois de experimentar todos êstes métodos e outros de menor importância de que tivemos conhecimento, chegamos à conclusão de que o melhor dêles era o original de Papanicolaou, ligeiramente modificado para se poder graduar a aspiração do flúido vaginal. Utilizamos tubos de vidro esterilizados e secos, com cêrca de 17 cm de comprimento, 4 mm de diâmetro externo e 2 mm de diâmetro interno (correspondente à luz do tubo), apresentando, pois, uma parede de vidro com 1 mm de espessura, que nos pareceu suficientemente forte para não quebrar no interior da vagina durante as manipulações necessárias. O tubo é curvo numa extremidade e apresenta um orifício próximo a outra, orifício êsse situado em direção oposta à do recurvamento da outra extremidade; êsse orifício é por nós chamado "orifício de escapamento" (Fig. 1). Para crianças, usamos tubos semelhantes mas de dimensões menores.

As peras de borracha por nós empregadas são as de tipo Mercúrio n.º 1 (Rio Grande do Sul), que são suficientemente moles para fazer uma sucção moderada; elas são adaptadas à extremidade retilínea do tubo.

O tubo de vidro é introduzido na vagina pela sua extremidade curva, até que se tenha verificado que a mesma tocou o fundo de saco posterior, pois só o material contido nessa porção da vagina é que deve ser colhido. Comprime-se, então, a pera de borracha, fazendo-se sair o ar pelo orifício de escapamento, e, em seguida, oblitera-se êste com o dedo; a pera de borracha passa então a fazer sucção pela extremidade curva do tubo, cuja direção conhecemos, através da posição do orifício de escapamento, que, como dissemos, está situado no lado oposto. Faz-se movimentos de rotação com o tubo, da direita para a esquerda e da esquerda para a direita, afim de aspirar o máximo possível de flúido vaginal e, quando se verificar que não há mais aspiração, destapa-se o orifício de escapamento, fazendo assim entrar o ar para o interior da pipeta e da pera de borracha; esta manobra é útil porque evita o refluxo de material para o interior do tubo de vidro, o que dificultaria a execução posterior do esfregaço. A pi-

peta é então retirada e executa-se o esfregaço, graduando, por uma combinação de pressão na pera de borracha e maior ou menor obliteração do orifício de escapamento, a quantidade de flúido a ser depositada na lâmina. Tivemos sempre a preocupação de fazer um esfregaço muito pouco espêsso. Uma vez executado o esfregaço, êste é imediatamente imerso numa mistura de álcool a 95% e éter, em partes iguais.

A coloração dos esfregaços foi feita pelo método de Shorr (10), que nos pareceu o melhor para o fim a que nos propuzemos e que consiste essencialmente no seguinte:

1. Fixar o esfregaço enquanto úmido em álcool 95% — éter (1:1) por 1-2 minutos.

2. Corar 1 minuto com o corante único Shorr 3.

3. Desidratar em alcoois (70% — 95% e absoluto) mergulhando a lâmina cêrca de 10 vezes em cada frasco.

4. Clarificar pelo xilol.

5. Montar em damar ou em balsamo do Canadá.

O corante único recomendado por Shorr (Shorr 3 ou S 3) tem a seguinte composição:

Álcool etílico a 50%	100 cm³
Biebrich Scarlet (solúvel em água)	0.5 g
Orange G	0.25 g
Fast Green FCF	0.075 g
Ácido fosfotúngstico	0,5 g
Ácido fosfomolíbdico	0.5 g
Ácido acético glacial	1.0 cm³

Êsse método é o último de uma série de modificações introduzidas por Shorr em seu método original (11, 12) e nele emprega corantes (Biebrich Scarlet e Fast Green FCF) da firma americana "National Aniline and Chemical Company" em virtude da escassez dos produtos originalmente empregados (Ponceau de Xylidene e Licht Grün), que provinham da Alemanha. Nós empregamos o Biebrich Scarlet e o Licht Grün de Grübler, com bons resultados.

Uma vez corada, examinamos a lâmina ao microscópio para analisar a citologia existente e fazer, quando se desejou, a contagem percentual dos diferentes tipos celulares, assim como avaliar a quantidade de leucócitos, hematias, muco e o tipo da flora microbiana encontrada. A diferenciação morfológica das células vaginais foi feita de acôrdo com o critério estabelecido por Papanicolaou (4, 13), que nos pareceu melhor traduzir a realidade, por fugir à complicada

variedade de tipos descrita por outros autores (14, 7). Quanto à interpretação das propriedades corantes dos diversos elementos encontrados, seguimos os dados de Shorr (10); ao invés, porém, de denominarmos as células com citoplasma corado em vermelho-alaranjado de células cornificadas, chamamo-las de células acidófilas, reservando o termo "cornificado" para as células cujas alterações morfológicas permitam essa qualificação. As células com citoplasma corado em verde pelo Licht Grün e que Shorr denomina de células não cornificadas, foram por nós denominadas de células basófilas, embora realmente se trate de elementos não cornificados, e isso apenas para que houvesse harmonia de denominações.

Baseados nesses dados, podemos, então, distinguir 3 tipos de células nos esfregaços vaginais, que, em virtude de sua situação num epitélio vaginal proliferado pela ação de substâncias estrogênicas, foram por Papanicolaou denominadas células basais, células intermediárias e células superficiais. As células basais (outer basal cells), são as mais profundas, situadas próximo a túnica própria, e se caracterizam por serem de pequeno tamanho, núcleo vesiculoso e muito grande em relação ao tamanho da célula e com citoplasma sempre basófilo. As chamadas células basais internas (inner basal cells) não são encontradas em esfregaços e mesmo que o fossem não poderiam ser diferenciadas das chamadas células basais externas (outer basal cells): tal divisão só é justificada em cortes de epitélio.

Entre as células basais Papanicolaou descreve, por também apresentarem pequeno tamanho, as células de origem cervical; estas células têm caracteres próprios e deverão ser reconhecidas, pois aparecem geralmente em esfregaços de epitélio vaginal altamente proliferado, ao contrário das células basais típicas que são encontradas em esfregaço de epitélio vaginal pouco ou nada proliferado. As células intermediárias se caracterizam, de um modo geral, por serem alongadas e apresentarem um núcleo comumente alongado e excêntrico; o seu citoplasma é basófilo, podendo, todavia, ser acidófilo. As células superficiais são células chatas, de formato variável, núcleo vesiculoso ou picnótico, citoplasma basófilo ou acidófilo. As células cornificadas apresentam de característico a reabsorção ou fragmentação do núcleo, que poderá estar ausente nas células mais típicas.

Quando o epitélio vaginal está em repouso, isto é, não submetido a ação proliferadora das substâncias estrogênicas, êle é constituido únicamente por células basais, dispostas em um número de camadas muito reduzido, em geral duas. Logo, porém, que êle fique submetido a ação do hormônio folicular, o que se dá é, fundamentalmente, uma proliferação à custa das células basais. À medida que o epitélio se espessa, as células mais superficiais vão, a princípio, se alongando e posteriormente se achatando, de modo a diferenciar as cé-

lulas intermediárias e superficiais. À medida que essas células se vão afastando da camada basal torna-se cada vez mais difícil a sua nutrição e elas vão sendo sede de processos degenerativos, tais como picnose do núcleo, acidofilia do citoplasma e cornificação. Tais processos, juntamente com as modificações de tamanho das células, traduzem a ação das substâncias estrogênicas sôbre o epitélio vaginal. A ordem de aparecimento dessas modificações num epitélio sob ação de estrógenos nem sempre é a mesma e a importância dêsse fenômeno, assim como a do valor da sua maior ou menor intensidade, constitui objeto atual de nossas investigações.

MATERIAL

Procedemos a exames do flúido vaginal em meninas, em fase comprovadamente pré-puberal, em adolescentes tanto normais como com atraso da menarca ou com amenorréia primária, em mulheres adultas eumenorreicas, em casos de amenorréia secundária (pelo menos um deles acompanhado repetidamente durante o tratamento hormonal pelos estrógenos), em casos de menopausa e em alguns casos de distúrbios menstruais não especificamente aqui mencionados.

Nosso material é ainda escasso, pois compreende apenas 26 casos; tratando-se, porém, de casos bem selecionados, nos quais foi excluida a existência de qualquer infecção do trato genital susceptível de alterar os resultados, parece-nos lícito tirar dêles conclusões.

Desejamos, como já foi dito, relatar apenas o que o estudo do nosso material e os trabalhos de outros autores nos sugeriram em relação ao valor do método como meio de se avaliar a atividade ovariana num dado caso. Posteriormente, quando contarmos com maior número de casos, publicaremos dados estatísticos sôbre a freqüência do que será dito a seguir.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Nos casos de ausência total de atividade ovariana, isto é, de meninas em fase comprovadamente prépuberal, em que não havia nem esbôço de caracteres sexuais secundários e a genitália era infantil, obtivemos sempre aquilo que Papanicolaou chama de esfregaço vaginal de tipo atrófico. Achamos mais conveniente denominar êste tipo de esfregaço, de *esfregaço de epitélio vaginal em repouso*, isto é, *não submetido a ação estrogênica* e justificamos essa denominação em virtude da insignificante excreção de estrógenos encontrada em meninas impúberes (15), bem como por ser a atividade estrogênica a única que repercute de modo indubitável sôbre o epitélio vaginal (16, 17, 18). A ação



da progesterona sôbre êsse epitélio ainda é discutida, poucas sendo as pesquisas até agora feitas para evidenciá-la (19).

Nesse tipo de esfregaço vaginal a quase totalidade das células encontradas é de tipo basal, havendo apenas uma ou outra célula intermediária ou superficial com citoplasma basófilo, raríssimamente acidófilo. Há, também, regularmente, um grande número de leucócitos e uma quantidade regular de muco (Figs. 2 e 3).

Esfregaços vaginais dêsse tipo foram também encontrados na menopausa com vários anos de duração por PAPANICOLAOU e SHORR (16), apenas com a diferença de, ao lado da abundância de células basais, haverem aqueles autores encontrado um número relativamente maior de células intermediárias e superficiais do que o observado nos nossos casos de meninas em fase comprovadamente prépuberal. Tais células eram, todavia, em número escasso e com citoplasma raramente acidófilo. TINOCO CABRAL (34) tem o mérito de haver sido o primeiro a descrever êsses esfregaços vaginais da menopausa.

Em adolescentes ainda não menstruadas, mas cujos caracteres sexuais secundários estavam se desenvolvendo normalmente e assim como nos primeiros anos da menopausa, isto é, em períodos de transição entre a ausência de atividade ovariana e a plena atividade ovariana da mulher adulta, o aspecto dos esfregaços vaginais que obtivemos foi muito variável, dependendo do grau dessa atividade e da sua repercussão sôbre o epitélio vaginal. Como a atividade ovariana é uma atividade cíclica, que se traduz por uma alternância de periodos em que ora há aumento e ora diminuição na concentração de estrógenos do organismo, é possível que ela possa se realizar em níveis subnormais, onde a menstruação ou não exista ou, se existir, se traduza apenas pelo aparecimento microscópico de hematias. Pelo menos, em relação à menopausa, é o que poude evidenciar PAPANICOLAOU (20, 16), que encontrou, por duas vezes, em um caso de menopausa examinado diàriamente durante seis mêses, a transformação gradual do esfregaço de tipo atrófico em um esfregaço de tipo folicular, seguido de um pequeno período em que apareciam eritrocitos e do retôrno do esfregaço novamente ao tipo atrófico. É possível, num exame diário de um grande número de casos, não só de menopausa mas também de adolescentes normais não menstruadas, descobrirmos em que extensão tal ocorrência existe e assim contribuir para esclarecer alguns aspectos do fenômeno da menstruação.

Dessas considerações se deduz que a citologia vaginal em tais períodos de transição não só é variável em relação ao nivel em que o ovário exerce a sua atividade, mas também, numa mesma paciente, em relação às variações por que passa essa atividade. Todavia, baseado num único exame, pudemos, de um modo geral, encontrar nesses períodos dois tipos de esfregaços vaginais, a que denominamos:

1. *Esfregaço de epitélio vaginal sob pequena ação estrogênica*, em que as células epiteliais encontradas são, na grande maioria, ainda de tipo basal; em número pequeno e variável, de tipo intermediário e superficial, com citoplasma basófilo e, mais raramente, acidófilo (Fig. 4). O número de leucócitos é variável e, de um modo geral, tanto maior quanto menor fôr a porcentagem de células epiteliais superficiais existentes. A quantidade de muco é também variável e, nos casos de menopausa, os esfregaços vaginais dêste tipo contêm com freqüência um número maior ou menor de eritrocitos.

2. *Esfregaço de epitélio vaginal sob moderada ação estrogênica*, em que predominam de modo nítido as células epiteliais superficiais, em grande maioria com citoplasma basófilo e algumas vezes acidófilo. A picnose nuclear é rara. As células de tipo basal e intermediário, principalmente as primeiras, são encontradas em quantidade pequena e variável e os leucócitos, em geral, são abundantes. Não há eritrocitos e a quantidade de muco é variável (Fig. 5).

Os dois tipos de esfregaços mencionados representam, todavia, apenas dois pontos de referência, necessários num estudo descritivo como o que estamos fazendo, durante uma série crescente de modificações encontradas desde o esfregaço de epitélio vaginal em repouso até o esfregaço de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica, encontrado na maior parte do ciclo menstrual da mulher adulta normal, como veremos mais tarde. Sempre os encontramos em nossos casos de adolescentes ainda não menstruadas, com exceção de um único, em que o esfregaço era nitidamente de tipo folicular, revelando ação estrogênica normal, exatamente igual à encontrada no meio do ciclo menstrual da mulher adulta normal; neste caso, as mamas e a genitália eram bem desenvolvidas, havendo regular número de pêlos pubianos, e é de se pressupôr que o ovário já estivesse desempenhando a sua função em nível normal e que essa nossa paciente estivesse já em vésperas da menarca. Não nos tendo sido possível acompanhar com exames repetidos êste caso, não podemos, porém, tirar conclusões a respeito dêle.

Os dois tipos descritos de esfregaços foram por nós também comumente encontrados em casos de amenorréia, tanto primária como secundária, e nos primeiros anos da menopausa. Papanicolaou (21), baseado no exame da citologia vaginal, propôs para as amenorréias em geral uma classificação em 3 grupos: a) em que o esfregaço vaginal é permanentemente atrófico, indicando ausência de atividade ovariana; b) em que o esfregaço vaginal é permanentemente de tipo intermediário entre o atrófico e o encontrado na mulher adulta normal, indicando atividade ovariana subnormal e uniforme e c) em que o esfregaço vaginal revela a existência de modificações cíclicas e irregulares, imitando as que existem no ciclo menstrual normal e traduzindo uma atividade ovariana periódica, todavia, insuficiente para produzir a menstruação. Os casos dêste último grupo são em tudo análogos aos de menopausa um pouco atrás relatados, em que foram demonstradas

variações periódicas no esfregaço vaginal. Êste fato foi por nós também verificado em u'a mulher solteira de 35 anos de idade, que apresentava amenorréia secundária de 20 anos de duração e obesidade; de acôrdo com PAPANICOLAOU, deve-se supor que o ovário de tal paciente estivesse funcionando em nivel subnormal, provàvelmente sendo essa a causa da falta de menstruação. Em outro caso de amenorréia secundária, no qual fizemos exames repetidos da citologia vaginal, encontramos sempre esfregaços vaginais de tipo sob moderada ação estrogênica; êste mesmo caso, sendo tratado posteriormente pelos estrógenos, apresentou, ao exame citológico do esfregaço vaginal, modificações caracteristicas de uma reação folicular, seguidas, alguns dias após à 3a. injeção de 10.000 U. I. de benzoato de estradiol, da eliminação de uma serosidade sanguinolenta. Neste caso havia concomitantemente obesidade do chamado tipo ovariano, antecedentes de hipo e oligomenorréia e esterilidade.

Na mulher adulta eumenorreica é geralmente admitido que o aspecto do esfregaço vaginal varia periòdicamente, sendo em número muito pequeno os autores que negam a existência de tais variações. A discussão entre os autores começa, entretanto, como já salientamos, quando se procura saber se tais variações periódicas apresentadas pelo epitélio vaginal e conseqüentemente refletidas no exame do flúido vaginal, estão ou não relacionadas com a função ciclica do ovário, como acontece com a mucosa uterina que indubitavelmente apresenta uma fase de proliferação e uma de secreção em cada ciclo menstrual normal.

Nos casos eumenorreicos, que examinamos diàriamente durante um a dois ciclos menstruais completos, constatamos sempre variações periódicas da citologia vaginal que, por se terem repetido com as mesmas caracteristicas durante cada ciclo examinado e apresentado a mesma duração dêle, consideramos correlatas à função ciclica do ovário. Experimentalmente tal correlação já foi demonstrada em macacas por ALLEN (25).

A nosso vêr, a dificuldade encontrada pelos autores que não puderam interpretar essas variações, considerando-as pouco nitidas, de dificil interpretação e não permitindo precisar o que realmente está se passando no ovário, decorre do uso de métodos que não permitem uma boa diferenciação entre os elementos celulares, como é o caso do primitivo método de PAPANICOLAOU (4), geralmente empregado por todos e hoje substituido até mesmo pelo próprio autor (26, 27). Demos preferência ao método de coloração de SHORR (10), que torna bem evidentes tais variações, corando o citoplasma dos elementos acidófilos (cornificados, segundo o autor) em vermelho-alaranjado e o dos basófilos (não cornificados, segundo o autor) em verde, mais intenso nos elementos mais jovens e mais pálido nos elementos mais diferenciados.

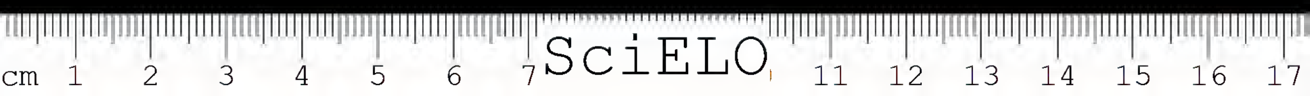
As variações encontradas em nossos casos e cuja existência já mencionamos serão descritas pormenorizadamente mais adiante, no estudo de cada fase do ciclo

menstrual. O fato que nelas mais chama a atenção é o aumento do número de células acidófilas que ocorre durante a chamada fase folicular; o número dessas células vai aumentando até atingir um valor máximo, mais ou menos no meio do ciclo menstrual, para em seguida decrescer até atingir a um valor mínimo na fase menstrual e no início da fase folicular seguinte. Tal fato tem sido encontrado também por outros autores (13, 28, 14) e portanto repetidamente confirmado. Papanicolaou (13) diz mesmo textualmente: "During the early part of the follicular phase both basophilic and acidophilic superficial type cells are well represented with the basophilic usually in the majority. As the follicular reaction approaches its peak, the superficial squamous cells become larger and more discret, while the acidophilic cells increase in number and often become predominant".

Para êsse aumento do número de células acidófilas adotamos a sugestiva denominação de Papanicolaou, que se vê no texto citado, e que é a de "reação folicular". Durante a fase proliferativa ou pré-ovulatória dêsse autor, o que há é uma típica reação folicular. Essa reação êle a interpreta como sendo conseqüente a um aumento da quantidade de estrógenos em ação sôbre o epitélio vaginal. Experimentalmente ela tem sido induzida por injeções de estrógenos em casos de menopausa (16) e de amenorréia secundária, conforme relatamos um pouco atrás.

Afim de documentar e demonstrar de uma maneira clara e objetiva as variações da citologia vaginal por nós encontradas, fizemos, durante os ciclos menstruais normais que examinamos, a contagem diária dos elementos epiteliais com citoplasma basófilo e com citoplasma acidófilo, afim de estabelecer o seu valor percentual nas diferentes fases do ciclo. Tal procedimento já foi também empregado por outros autores (14, 28). O seguinte gráfico traduz nitidamente essas variações durante o ciclo menstrual normal de u'a mulher adulta eumonorreica, com intervalos de 28 dias entre as menstruações. A porcentagem de células acidófilas é pequena tanto na fase menstrual, como nos dias subseqüentes, a grande maioria dos elementos epiteliais existentes nessa ocasião apresentando citoplasma basófilo. À medida que decorrem os dias, o número de células acidófilas vai, de um modo geral, com pequenas oscilações diárias, aumentando até às proximidades do meio do ciclo menstrual, quando então apresenta um aumento mais ou menos súbito que, no caso em aprêço, foi de 27 para 68% em 48 horas. O valor percentual das células acidófilas permanece nesse nível máximo por alguns dias, com pequenas oscilações, e daí por diante vai, de um modo geral, através de grandes oscilações diárias, decrescendo, de sorte que na fase menstrual seguinte existem novamente poucas células com citoplasma acidófilo.

A reação folicular traduz o aumento da taxa de estrógenos que se dá durante o período de maturação folicular e o seu ápice, segundo Papanicolaou,



traduz o momento em que a ovulação deve se dar. Por essa razão, é possível que o súbito aumento do número de células acidófilas encontrado nêste caso seja o reflexo de uma ruptura folicular recente, com conseqüente súbito aumento



Gráfico

Variações do valor percentual das células acidófilas durante um ciclo eumenorreico de 28 dias.
Variations in the percentual value of acidophilic cells during an eumenorrheic cycle of 28 days.

da taxa de estrógenos no organismo e mais intensa atividade estrogênica sôbre o epitélio vaginal em constante descamação. Todavia, como tal fenômeno nem sempre é encontrado, o aumento das células acidófilas se fazendo às vezes de

modo gradual, não sabemos por enquanto qual seja a sua importância. O número relativamente alto de células acidófilas encontrado na segunda metade do ciclo menstrual talvez seja devido ao fato de o corpo lúteo também secretar hormônio estrogênico.

Não temos ainda elementos, isto é, um número suficiente de casos, para, baseado neles, dividir o ciclo menstrual em fases e, por isso, adotamos a divisão estabelecida por PAPANICOLAOU (4, 13).

Durante todo o ciclo menstrual normal predominam as células de tipo superficial. As células de tipo intermediário são às vezes encontradas em qualquer época do ciclo e as de tipo basal só raramente e apenas durante o período que vai do fim da fase pré-menstrual até o início da fase pré-ovulatória seguinte. Em virtude dêste fato e por serem geralmente de citoplasma basófilo os elementos superficiais existentes nesse período, os esfregaços vaginais feitos na fase menstrual e no início da fase pré-ovulatória ou folicular, se assemelham aos esfregaços de epitélio vaginal sob moderada ação estrogênica e, como tal, podem ser classificados, mesmo em se tratando de mulher adulta eumenorréica.

Os esfregaços vaginais feitos desde o fim da fase pré-ovulatória até quase o fim da fase pré-menstrual seguinte, em que há um número variável de células epiteliais superficiais basófilas e acidófilas e, às vezes, um número variável de células intermediárias, constituem o que denominamos de *esfregaço de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica.* Neles o número de leucócitos e a quantidade de muco são variáveis em relação às diferentes fases do ciclo. As figuras 8, 9 e 10 são exemplos dêste tipo de esfregaço, durante as várias fases do ciclo menstrual.

Fase menstrual: Tem a duração de 7 dias e se inicia quando se notam os primeiros sinais macroscópicos de menstruação; caracteriza-se nos três a quatro primeiros dias pela perda macroscópica de sangue e, nos esfregaços vaginais, pela existência de numerosas hematias.

A presença de hematias em outras épocas do ciclo só raramente é encontrada, exceto na chamada zona ovulatória, onde foi descrita (4) uma pequena hemorragia microscópica subseqüente à ruptura do folículo e sôbre cujo significado não há acôrdo entre os autores.

Sob outros aspectos o esfregaço vaginal da fase menstrual é análogo ao do início da fase pré-ovulatória ou folicular a ser descrita logo a seguir. Êle pode apresentar, todavia, de característico, células do endométrio exfoliado, principalmente nos 2.º e 3.º dias quando o sangramento menstrual é mais intenso. Essas células, quando isoladas, são dificilmente reconhecíveis, confundindo-se com os histiocitos, e porisso as percebemos sob a forma de fragmentos de tecido que uma vez encontrados têm valor patognomônico para o diagnóstico da fase.

Fase pré-ovulatória ou folicular: Tem a duração de cêrca de 4 dias, ou seja, dura do 8.º ao 12.º dia do ciclo. Predominam as células epiteliais superficiais e, entre estas, as de citoplasma basófilo; todavia, à medida que se vai aproximando o fim da fase, as células epiteliais superficiais com citoplasma acidófilo vão gradativamente aumentando em número. Há também freqüentemente células de tipo intermediário e, às vezes, apenas no início da fase, células de tipo basal (Fig. 6).

À medida que aumenta o número de células acidófilas, as células vão se tornando maiores e mais chatas e vai havendo uma diminuição do tamanho do núcleo, que tende a tornar-se picnótico (Fig. 7). Êsse aumento é, todavia, variável e o número máximo de células acidófilas encontrado será maior ou menor segundo êste ou aquele caso; Papanicolaou fala apenas em predominância (13), Rubenstein encontrou valores até 100% (28) e nós valores de 60 a 80%.

No início desta fase há uma grande quantidade de muco e numerosos leucócitos, e à medida que se aproxima o fim vai havendo, geralmente, uma progressiva leucopenia.

Fase pós-ovulatória: Tem a duração de cêrca de 5 dias, isto é, dura do 13.º ao 17.º dia do ciclo. Entre ela e a anterior estaria a zona de ovulação de Papanicolaou, que se caracteriza por um súbito aumento da quantidade de leucócitos e, às vezes, pela presença de uma hemorragia microscópica (4); estas modificações são, todavia, de difícil constatação, não existindo ainda acôrdo geral em relação à sua existência.

Predominam como sempre as células superficiais e o início da fase se caracteriza por uma leve diminuição ou uma igualdade do valor percentual das células acidófilas em relação à última verificação feita. De um modo geral, os elementos basófilos vão gradativamente aumentando em número e, em virtude da maior descamação existente, as células apresentam os bordos comumente dobrados oferecendo um aspecto muito irregular, tendendo a se colocarem em grupos, às vezes grandes, de células descamadas. São freqüentes as placas de células descamadas e a picnose do núcleo é ainda freqüentemente encontrada. Os leucócitos, a princípio escassos, tendem a aumentar em número com o decorrer da fase (Fig. 8).

Fase pré-menstrual: Tem a duração de cêrca de 10 dias, isto é, dura do 18.º ao 28.º dia do ciclo. As células epiteliais superficiais basófilas predominam francamente sôbre as acidófilas e essa predominância é tanto maior quanto mais próxima a fase menstrual, embora seja variável, isto é, maior ou menor, com o decorrer da fase. A picnose nuclear é mais rara e vai gradualmente desaparecendo. O número de leucócitos é muito variável, tanto maior quanto mais próxima a fase menstrual (Fig. 9).

É difícil estabelecer um marco de separação entre esta fase e a anterior, assim como é possível confundir-se um esfregaço feito nesta fase com outro feito no início da fase pré-ovulatória. Por esssa razão, às vezes, são necessários 2 a 3 esfregaços consecutivos para se conseguir determinar a fase do ciclo.

Ação dos andrógenos: A ação do hormônio androgênico sôbre o epitélio vaginal se exerce em sentido contrário ao das substâncias estrogênicas e, porisso, tem sido denominada de antiestrogênica. Tal ação foi pesquisada por vários autores (28), tendo ficado demonstrado que ela determina em mulheres adultas normais, a parada do fluxo menstrual e uma involução do epitélio vaginal que se torna atrófico; estas modificações segundo os referidos autores podem ser acompanhadas pelo exame da citologia vaginal, onde se notará a transição gradual do esfregaço de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica da mulher adulta normal para um esfregaço de epitélio vaginal em repouso ou sob ação estrogênica nula.

A maneira pela qual os andrógenos exercem essa ação sôbre o epitélio vaginal ainda é discutida; se bem que pareça que êles atuem diretamente sôbre o epitélio vaginal (29), é possível que a sua atividade se exerça inibindo a ação gonadotrópica da hipófise, dêsse modo diminuindo indiretamente o estímulo estrogênico sôbre o epitélio vaginal (30, 31).

Ação do fator gonadotrópico: A ação da fração gonadotrópica da hipófise sôbre o epitélio vaginal se exerce através do ovário e é porisso idêntica à dos estrógenos; ela já foi demonstrada na espécie humana por Shorr e Papanicolaou (32).

O exame da citologia vaginal, em virtude da simplicidade de sua técnica, pode ser utilizado rotineira e intensamente no estudo dos problemas concernentes à fisiologia e patologia ovariana, permitindo não só uma melhor compreensão das diversas ginecopatias endócrinas, como também uma terapêutica melhor orientada das mesmas.

Assim, pelo seu estudo, nos é possível determinar o estado funcional dos ovários em casos de amenorréias, tanto primárias como secundárias, e de menopausa. A existência de variações cíclicas nesses casos revela um ovário funcionante mas não em grau suficiente para que a menstruação se dê.

A terapêutica estrogênica nesses casos poderá ser regulada pelo exame repetido da citologia vaginal, evitando-se conseqüentemente o emprêgo de doses excessivas, superiores às necessárias para a produção de uma reação folicular típica, que, de per si, bastaria ao tratamento, como já foi demonstrado para a menopausa (16).

A terapêutica pelos hormônios gonadotrópicos também de muito se beneficiará sendo acompanhada pelo exame da citologia vaginal; a falta de resposta do ovário, no caso de uma glândula atrófica ou hipoplásica, assim como a insuficiência da dose empregada, poderiam ser precocemente descobertas pelo não aparecimento das alterações de tipo folicular no esfregaço vaginal.

No tratamento androgênico das ginecopatias será útil, através dos esfregaços vaginais, determinar a dose necessária para induzir modificações atróficas no epitélio vaginal e assim evitar o emprêgo de doses excessivas. Do mesmo modo, a castração radiológica poderá ser controlada e avaliada através das modificações que aparecerem na citologia vaginal.

O método dos esfregaços vaginais tem ainda, ao que parece, uma grande aplicação como meio de testar na espécie humana as substâncias estimulantes ou inibidoras da estrogênese, à semelhança do que se faz para a tiróide dessecada, em que se empregam casos de mixedema com metabolismo basal baixo.

Nos problemas de esterilidade, êsse método pode ser usado para a determinação da época em que a ovulação se deve dar. D'AMOUR (33), em trabalho recente, comparando diversos métodos utilizados para a determinação da época da ovulação, dá grande valor ao método dos esfregaços vaginais.

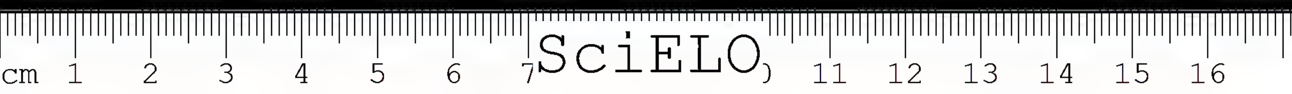
No nosso entender o exame da citologia vaginal é um exame de real valor e com múltiplas aplicações, das quais citamos apenas as principais; de um modo geral, sempre que o estudo da função ovariana se fizer necessário êsse método poderá ser utilizado para refletir, de modo fácil e mais ou menos seguro, as variações da taxa de substâncias estrogênicas, que, em última análise, traduzem fenômenos que ocorrem nos ovários durante o ciclo menstrual e particularmente durante as diversas fases da vida sexual feminina. O exemplo mais recente de um tal estudo é o do emprêgo dos esfregaços vaginais com o fim de traduzir as alterações cíclicas da função ovariana para correlacioná-las com as alterações que se operam no psiquismo e interpretadas à luz da psicanálise (23, 24).

SUMÁRIO

Foram relatados os resultados obtidos com o exame da citologia vaginal humana durante o ano de 1943, na Seção de Endocrinologia do Instituto Butantan.

Preliminarmente foi estudada a questão técnica, e então apresentada uma modificação da pipeta utilizada por PAPANICOLAOU.

Os casos estudados foram os mais variados de modo a tornar possivel uma visão de conjunto. Foram feitos exames em meninas em fase comprovadamente prepuberal, em adolescentes, tanto normais como com atraso da menarca ou com amenorréia primária, em mulheres adultas eumenorréicas, em casos de ame-



norréia secundária, pelo menos um dêles acompanhado repetidamente durante o tratamento hormonal pelos estrógenos, em casos de menopausa e em alguns casos de distúrbios menstruais.

Foi sugerida a classificação dos esfregaços vaginais encontrados em 4 tipos gerais: 1.º) esfregaços de epitélio vaginal em repouso, isto é, não submetido à ação estrogênica; 2.º) esfregaços de epitélio vaginal submetido a pequena ação estrogênica; 3.º) esfregaços de epitélio vaginal submetido a moderada ação estrogênica e 4.º) esfregaços de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica.

Foram encontradas, confirmando os achados de PAPANICOLAOU, RUBENSTEIN e outros, modificações cíclicas da citologia vaginal durante o ciclo menstrual normal, tendo sido possivel, por meio da contagem dos diferentes elementos celulares, tornar mais evidente a chamada reação folicular caracteristica da época em que a ovulação deve se dar.

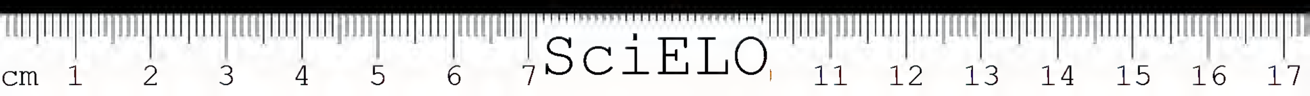
Finalmente, com base nos resultados obtidos e no de outros autores, foram analisadas as possibilidades do método como meio de estudar a função ovariana e traduzir as variações da taxa de substâncias estrogênicas, durante o ciclo menstrual e as diversas fases da vida sexual feminina.

ABSTRACT

The results with the vaginal smear technic in patients from the "Seção de Endocrinologia do Instituto Butantan" are presented. The material was obtained by using a curved glass pipette, a slight modification of that of PAPANICOLAOU, and stained by the Shorr's method.

The cases studied were of normal prepubertal or adolescents girls, with delayed menarche or primary amenorrhea, adult eumenorrheic women, secondary amenorrhea or others disorders of the menstrual cycle and menopause.

A classification of the vaginal smears in four general types was suggested: 1.) smears from vaginal epithelium no submitted to estrogenic action, characterized by cells of the outer basal type and numerous leucocytes: 2) smears from vaginal epithelium submitted to slight estrogenic action, characterized by an increasing number of cells of the intermediate and superficial types with basophilic cytoplasm and vesiculous nucleus;. 3.) smears from vaginal epithelium submitted to moderate estrogenic action, characterized by a greater number of superficial cells with still predominantly basophilic cytoplasm and vesiculous nucleus, and, finally; 4.) smears from vaginal epithelium submitted to full estrogenic action, characterized by the greatest number of superficial cells with predominantly acidophilic cytoplasm and picnotic nucleus and a few leucocytes.

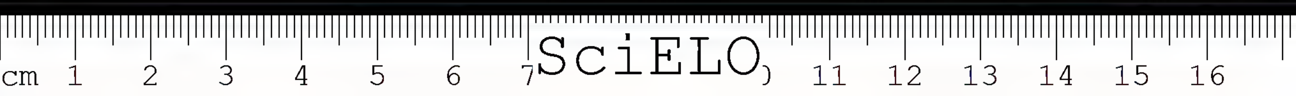


In the adult eumenorrheic women, cyclic modifications of the vaginal citology were encountered, in agreement with the findings of PAPANICOLAOU, RUBENSTEIN and others. The so called follicular reaction was evidenced by counting the cells during all the cycle.

The possibilities of the vaginal smear technics a method of studying the human ovarian function through the variations in organic estrogenic levels and its action in vaginal epithelium were considered.

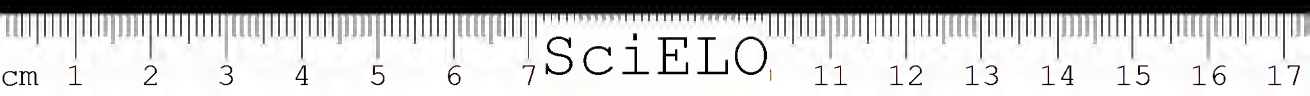
BIBLIOGRAFIA

1. *Stockard, C. R. & Papanicolaou, G. N.* (1917). The existence of a typical oestrus cycle in the guinea pig with a study of its histological and physiological changes. *Amer. J. Anat.*, **22**, 225.
2. *Allen, E. & Doisy, E. A.* (1923). An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction, partial purification and action, on test animals. *J. Amer. med. Ass.*, **81**, 819.
3. *Di Paola, G.* (1941). Citologia vaginal y funcion ovarica en la mujer. *Rev. Med. Quir. de Pat. Feminina*, **17**, 102.
4. *Papanicolaou, G. N.* (1933). The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears. *Amer. J. Anat.*, **52**, 519.
5. *Salmon, U. J., Walter, R. I. & Geist, S. H.* (1938). Effect of testosterone propionate on glucogen content of human vaginal smears. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, **39**, 467.
6. *Geist, S. H. & Salmon, U. T.* (1939). Evaluation of human vaginal smear in relationship to the histology of the vaginal mucosa. *Amer. J. Obst. & Gynec.*, **38**, 392.
7. *Rubenstein, B. B.* (1940). The vaginal smear-basal body temperature technic and its aplication to the study of functional sterility in women. *Endocrinology*, **27**, 843.
8. *Fournier, J. C. M., J. M. Manaro, S. M. & Blanco, V.* (1942). Valor clinico del examen del exudato vaginal. *Arch. Clin. e Inst. de End. da Fac. Med. Montevideo*, **2**, 211.
9. *Mack, H. C.* (1942). A new and rapid method of staining vaginal smears based upon a specific color reaction for glycogen. *Harper Hosp. Bull.*, **1**, 54; apud *Mack, H. C.* (1943). Vaginal smear technic. *J. of Clin. Endocr.*, **3**, 169.
10. *Shorr, E.* (1941). A new technic for staining vaginal smears: III, A single differential stain. *Science*, **94**, 545.
11. *Shorr, E.* (1940). A new technic for staining vaginal smears. *Science*, **91**, 321.
12. *Shorr, E.* (1940). A new technic for staining vaginal smears: II. *Science*, **91**, 579.
13. *Papanicolaou, G. N. & Traut, H. F.* (1943). *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear.* New York: The Commonwealth fund.
14. *Murray, E. G.* (1941). *El ciclo vaginal humano, sus modificaciones fisiologicas y patologicas.* Buenos Aires: Editor Amiceto Lopez.
15. *Dorfman, R. I., Grenlich, W. W. & Solomon, C. I.* (1937). The excretion of androgenic and estrogenic substances in urine of children. *Endocrinilogy*, **21**, 741.



16. *Papanicolaou, G. N. & Shorr, E.* (1936). The action of ovarian follicular hormone in the menopause, as indicated by vaginal smears. *Amer. J. Obst. & Gynec.*, 31, 806.
17. *Schneider, P.* (1939). Prophylactic endocrine therapy in artificial menopause. *Amer. J. Obst. & Gynec.*, 37, 861.
18. *Allen, E., Smith, G. M. & Gardner, W. U.* (1936). Acentuation of the growth effect of theelin on genital tissues by arrest of mitosis with colchicine. *Anat. Rec.*, 67, 49.
19. *Mack, H. C.* (1943). Vaginal smear technic. *J. clin. Endocrinology*, 3, 169.
20. *Papanicolaou, G. N.* (1933). The existence of a "postmenopausae" sexual rhythm in women, as indicated by the study of vaginal smears. *Anat. Rec.*, 55, 71.
21. *Papanicolaou, G. N.* (1939). Action of gonadotropic hormones in amenorrhea as evaluated by vaginal smears. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 41, 629.
22. *Rubenstein, B. B.* (1937). The relation of cyclic changes in human vaginal-smears to body temperatures and basal metabolic rates. *Amer. J. Physiol.*, 119, 635.
23. *Benedek, T. & Rubenstein, B. B.* (1939). Tre correlations between ovarian activity and psychodynamic processes: I. The ovulative phase. *Psychosomatic Medicine*, 1, 245.
24. *Benedek, T. & Rubenstein, B. B.* (1942). The sexual cycle in women; cap. 3, p. 31-44, Washington, D. C. National Research Council, *Psychosomatic Medicine Monographs*, 3, 1-2.
25. *Allen, E.* (1937). The menstrual cycle of the monkey, macacus rhesus: observations on normal animals, the effects of removal of the ovaries and the effects of injections of ovarian an placental extracts into the spayed animals. *Contr. to Embr. n. 98. Carnegie Inst.* Wash. Pub. 380: 19, 3.
26. *Papanicolaou, G. N.* (1941). Some improved methods for staining vaginal smears. *J. Lab. clin. Med.*, 26, 1200.
27. *Papanicolaou, G. N.* (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, 95, 438.
28. *Papanicolaou, G. N., Ripley, H. S. & Shorr, E.* (1939). Suppressive action of testosterone propionate on menstruation and its effect on vaginal smears. *Endocrinology*, 24, 339.
29. *Shorr, E., Papanicolaou, G. N. & Stimmel, B. F.* (1938). Neutralization of ovarian folicular hormone in women by simultaneous administration of male sex hormone. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 37, 759.
30. *Robson, J. M.* (1938). Quantitative data on the inhibition of oestrus by testosterone. progesterone and certain other compounds. *J. Physiol.*, 92, 371.
31. *Zuckerman, S.* (1938). The influence of testosterone propionate on the changes induced in monkeys by gonadotrophic hormone. *J. Physiol.*, 93: Proceedings 15 p.
32. *Shorr, E. & Papanicolaou, G. N.* (1939). Action of gonadotropic hormones in amenorrhea as evaluated by vaginal smears. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 41, 629.
33. *D'Amour, F. E.* (1943). A comparison of methods used in determining the time of ovulation. *J. clin. Endocrinology*, 3, 41.
34. *Cabral, T.* (1928). Modificações das células epiteliais da vagina humana na gravidez e na menopausa. *Tese Fac. Med. Univ. S. Paulo.*

(Recebido para publicação em dezembro de 1944).



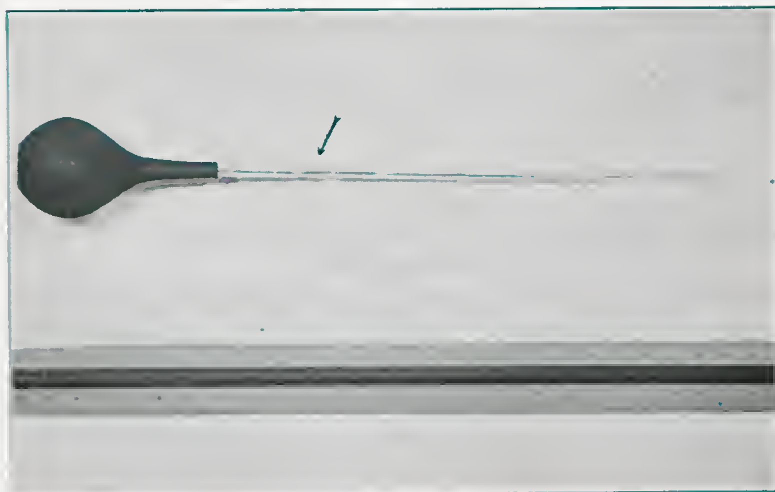


FIG. 1

Pipeta de vidro. Notar o orifício de escapamento.
Glass pipette. Note the opening for air passage.

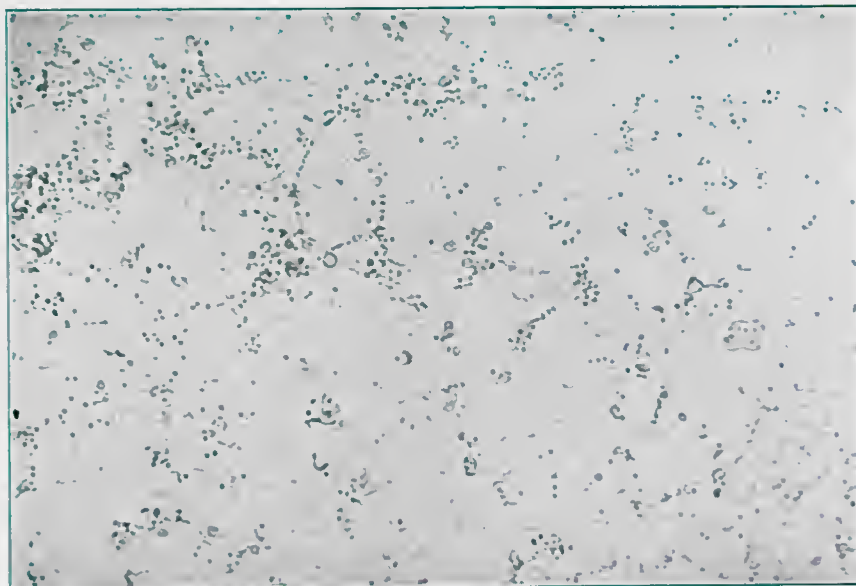


Fig. 2
Esfregaço de epitélio vaginal não submetido à ação estrogênica, obtido de menina impúbere. Pode ser encontrado também nos últimos períodos da menopausa. × 50.
Smear from vaginal epithelium no submitted to estrogenic action, from a girl in the prepubertal state. It is also found in the last periods of menopause.

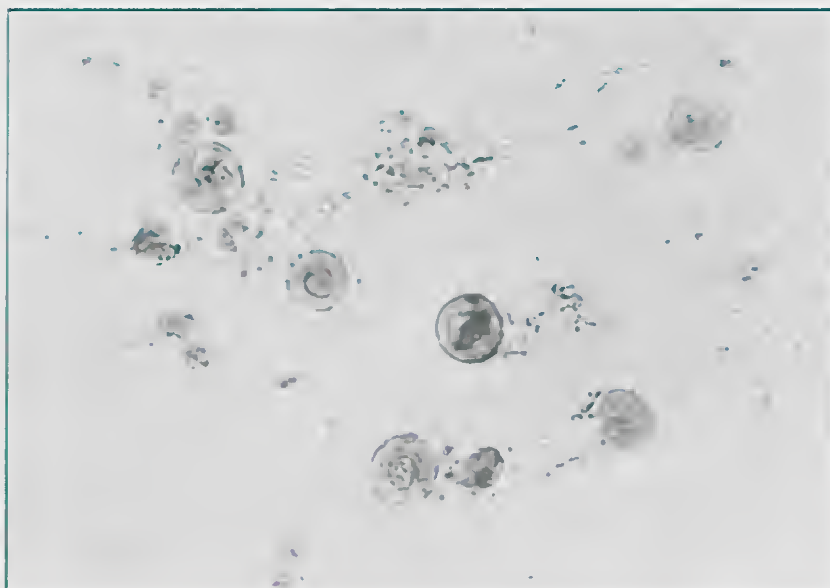


Fig. 3
Esfregaço de epitélio vaginal não submetido à ação estrogênica, em maior aumento para se verificar as células basais. × 300.
Smear from vaginal epithelium no submitted to estrogenic action in higher-power view, to see the outer basal cells.

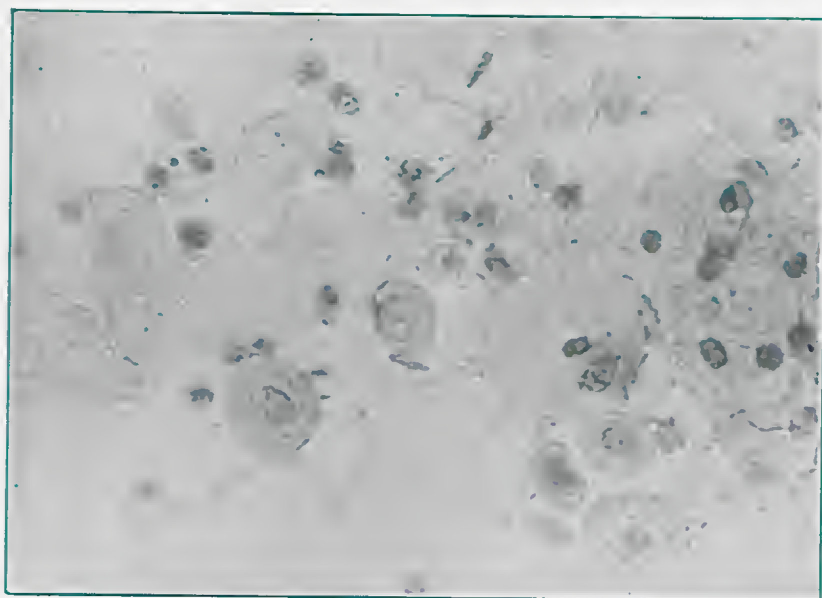


FIG. 4
Esfregaço de epitélio vaginal sob pequena ação estrogênica, obtido de uma mulher no segundo ano da menopausa. É encontrado também na adolescência. × 300.
Smear from vaginal epithelium submitted to slight estrogenic action, from a woman with two years of menopause. It is also found in adolescent girls.

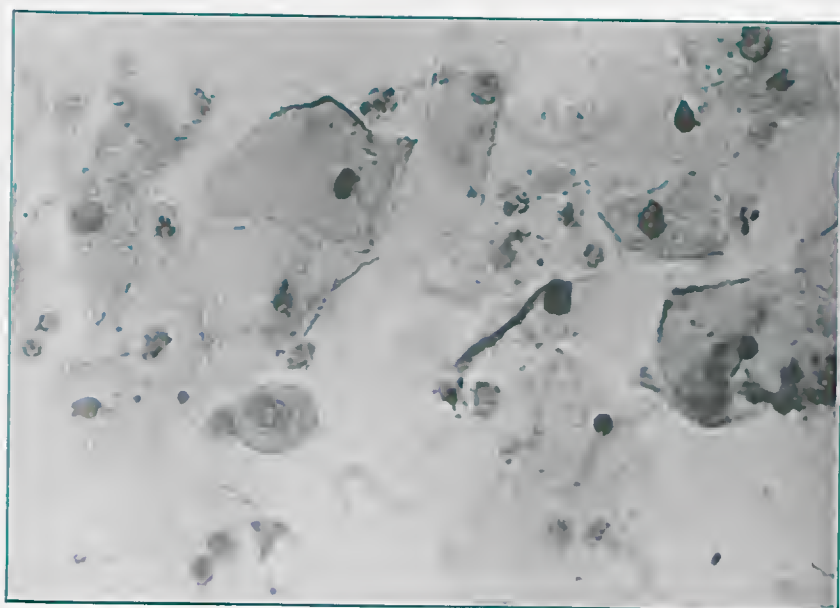


FIG. 5
Esfregaço de epitélio vaginal sob moderada ação estrogênica obtido em um caso de insuficiência ovariana (amenorréia). É também encontrado no início da menopausa, na adolescência e no início da fase pré-ovulatória. × 300.
Smear from vaginal epithelium submitted to moderate estrogenic action, from a case of ovarian failure (amenorrhea). It is also found in early menopause, adolescent girls and in the first part of the pre-ovulative phase.

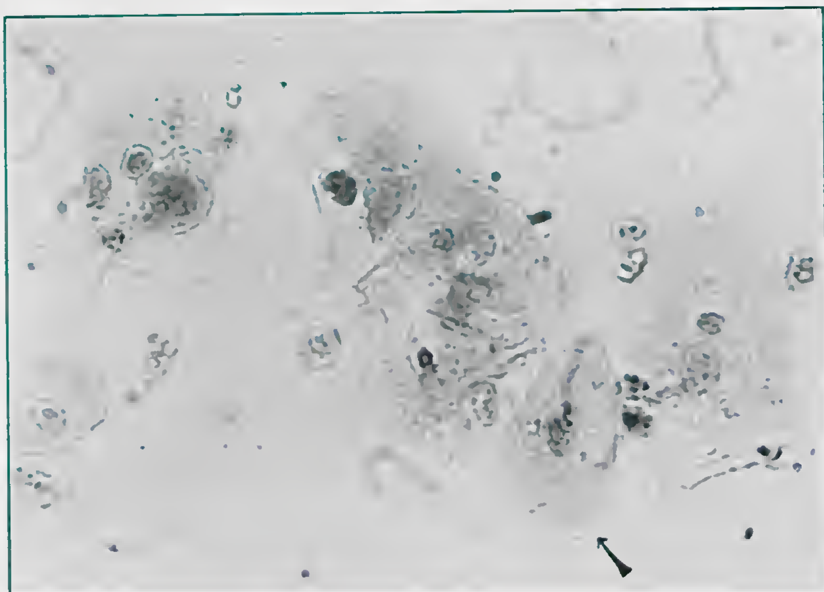


FIG. 6

Esfregaço de epitélio vaginal sob moderada ação estrogênica, do início da fase pré-ovulatória. Assinalada vê-se uma célula intermediária. × 300.

Smear from vaginal epithelium submitted to moderate estrogenic action, from the early part of the pre-ovulative phase. The arrow shows an intermediate cell.

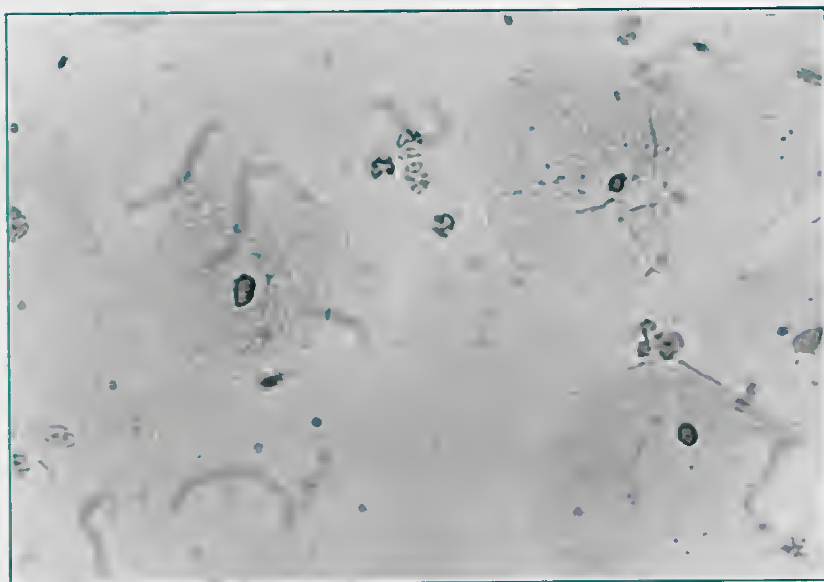


FIG. 7

Esfregaço de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica, do fim da fase pré-ovulatória ou folicular, traduzindo o ápice da reação folicular. Vêm-se sòmente células superficiais, a grande maioria com núcleo cariopicnótico e citoplasma acidófilo. × 300.

Smear from vaginal epithelium submitted to full estrogenic action, from the end of the pre-ovulative or follicular phase, corresponding to the peak of the follicular reaction. There is only superficial cells in the view, the great majority with picnotic nucleus and acidophilic cytoplasm.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XVIII — 1944-45

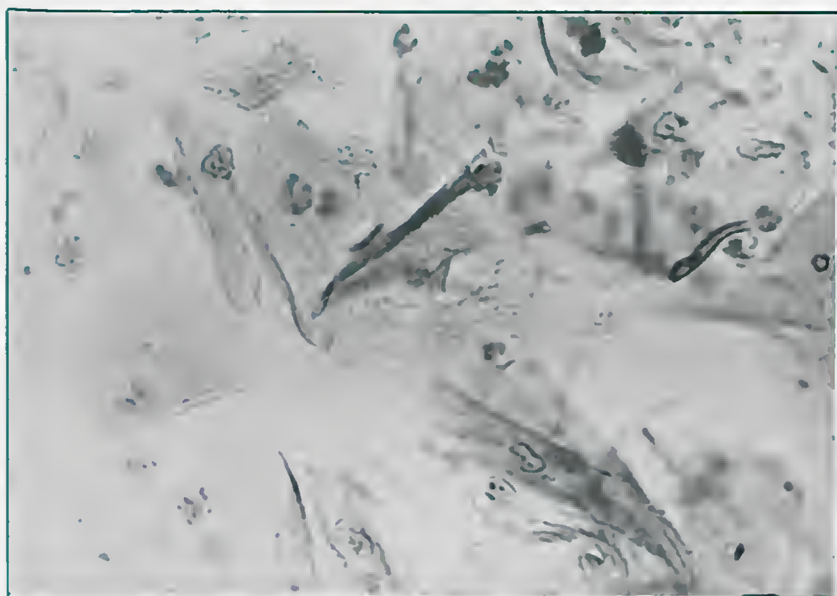


FIG. 8

Esfregaço de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica, da fase post-ovulatória. Nota-se grande número de células dobradas, traduzindo grande descamação. × 300.

Smear from vaginal epithelium submitted to full estrogenic action, from the post-ovulatory phase. There is a greater number of folded cells, corresponding to great descamation.

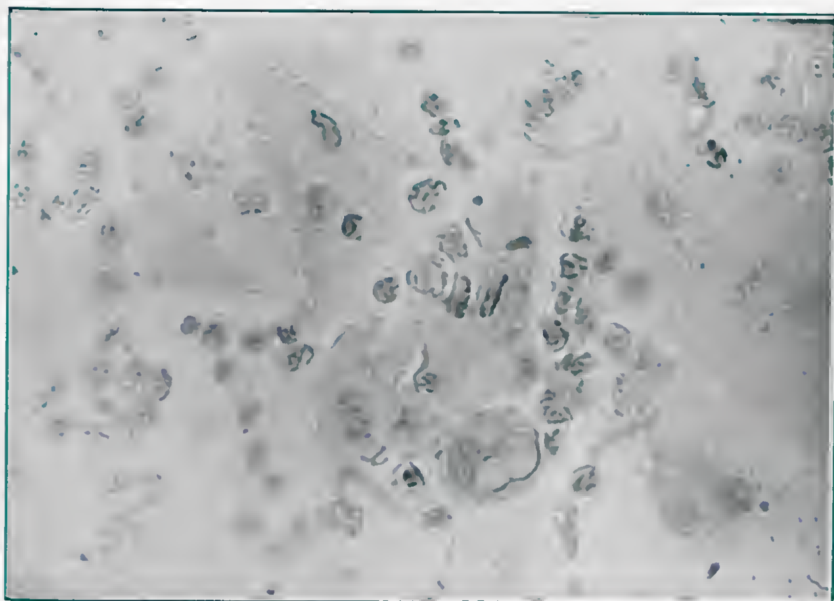


FIG. 9

Esfregaço de epitélio vaginal sob franca ação estrogênica da fase pré-menstrual. Notar o grande número de leucócitos. × 300.

Smear from vaginal epithelium submitted to full estrogenic action, from the premenstrual phase. There is numerous leucocytes.


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

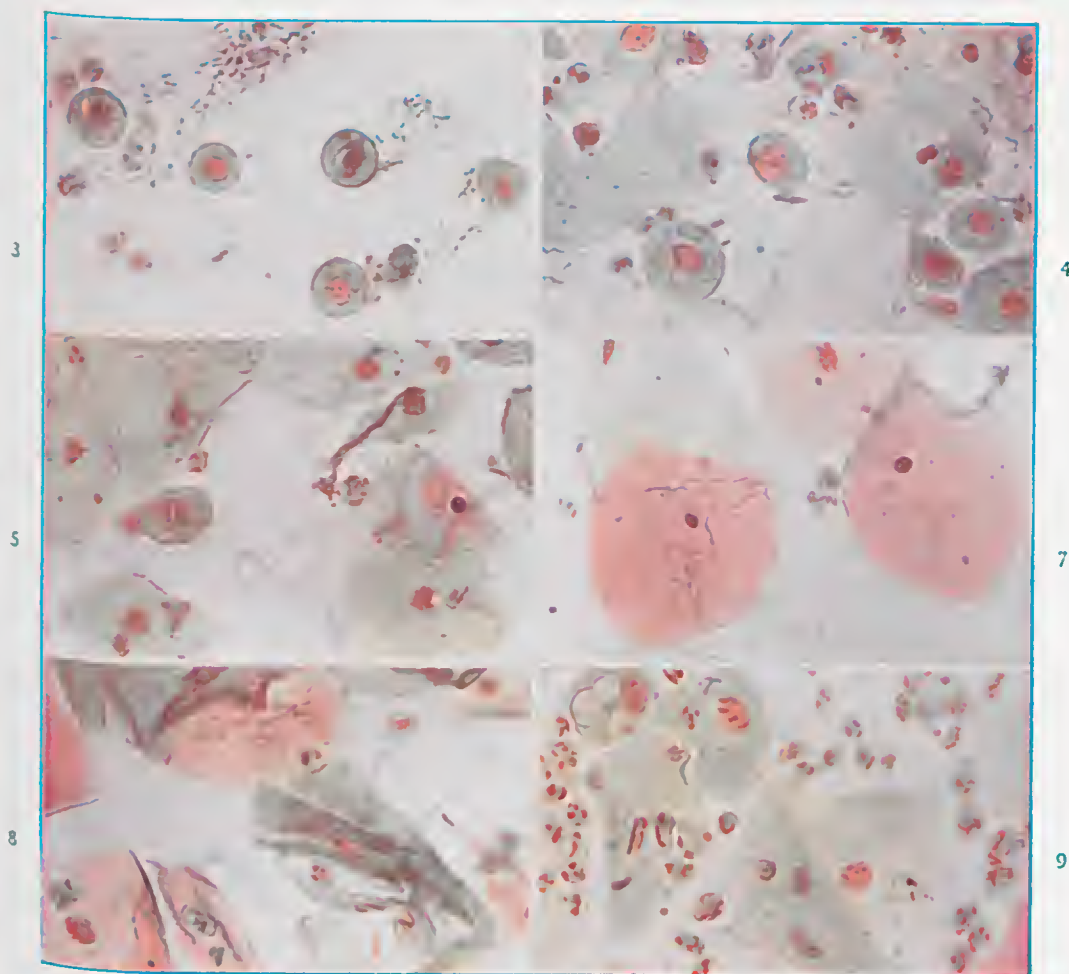


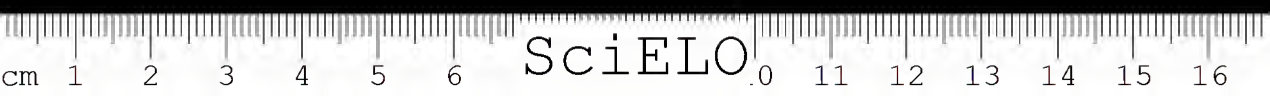
FIG. 10

Pequenos trechos a cores das microfotografias apresentadas. O número ao lado é o mesmo da figura da microfotografia correspondente. Os numeros 3, 4, 5 e 7 traduzem os 4 tipos gerais de esfregaços vaginais, a saber:

3 — Esfregaço de epitélio vaginal em repouso.
4 — Esfregaço de epitélio vaginal submetido a pequena ação estrogênica.
5 — Esfregaço de epitélio vaginal submetido a moderada ação estrogênica.
7 — Esfregaço de epitélio vaginal submetido a franca ação estrogênica.

Os números 5, 7, 8 e 9 traduzem as modificações cíclicas da citologia vaginal durante o ciclo menstrual normal:

5 — Início da fase pré-ovulatória.
7 — Fim da fase pré-ovulatória ou ápice da reação folicular, indicando o momento em que a ovulação deve se dar.
8 — Fase post-ovulatória.
9 — Fase pré-menstrual.


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

EFEITOS DE UM EXTRATO PRÉ-HIPOFISÁRIO SÔBRE AS ADRENAIS E O TIMO DE CAMUNDONGOS INFANTIS (*)

POR

L. MILLER DE PAIVA

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Os estudos sôbre as correlações entre a adrenal, a hipófise e o timo, bem como os trabalhos recentes sôbre o hormônio corticotrópico (1-3), induziram-nos à revisão da atividade corticotrópica de um extrato de lobo anterior de hipófise bovina. O teste mais seguro para o hormônio em aprêço é o da manutenção ou recuperação do pêso das adrenais de ratos hipofisoprivos (4); dada, porém, a dificuldade de se dispôr de elevado número de animais nessas condições, procuramos verificar aquele efeito em camundongos infantis, já empregados, entre outros, por JORES (5), na pesquisa do referido hormônio no sangue de hipertensos.

MATERIAL E MÉTODOS

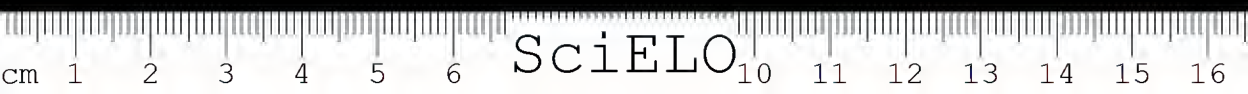
Empregamos neste trabalho 331 camundongos infantis, repartidos em 4 lotes: a) 100 machos e 78 fêmeas para a determinação do pêso normal das adrenais; b) 40 machos e 80 fêmeas normais, tratados; c) 15 machos castrados e, finalmente, d) 10 machos e 8 femêas castrados e adrenalectomizados.

À exceção do primeiro lote, os demais foram tratados ou com sôro fisiológico ou com uma solução de extrato de lobo anterior de hipófise bovina, preparado neste Laboratório, de acôrdo com o método de BATES e RIDDLE (6). Tal extrato, usado como ponto de partida para a obtenção da prolactina, possui também considerável atividade corticotrópica.

Os animais recebiam duas injeções subcutâneas diárias de 0.25 cm^3 durante 4 dias e, no 5.º dia, depois de pesados em jejum e sacrificados com éter, eram as adrenais e o timo desembaraçados dos elementos conjuntivos e pesados em balança

---

(*) Agradecemos à Diretoria do Instituto Butantan as facilidades concedidas e ao Dr. J. R. DO VALLE, pela orientação e estímulo durante o estágio que fizemos na Seção de Endocrinologia do referido Instituto.



de torção. Os animais não operados pesaram à autópsia de 7 a 14 g e os operados de 10 a 17 g, e isto por decorrer certo tempo, em média de 8 dias, entre a operação e o início do tratamento.

Os camundongos adrenoprivos eram mantidos em boas condições numa dieta rica em cloreto de sódio. As doses do extrato correspondiam ao total individual de 10, 15 e 20 mg da preparação sêca.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os pesos médios das adrenais e do timo nos diferentes grupos experimentais figuram na tabela I.

TABELA I

Grupos	Sexo	Condições	N.º de animais	Pêso corp. médio (g)	Tratamento	Pêso em mg.	
						Adrenais	Timo
A	♂	Normais	100	9.8	Nihil	3.1	—
B	♀	"	78	9 3	Nihil	3.9	—
C	♂	"	30	10.7	Sôro fisiológiro	3.7	32.6
D	♂	"	10	9.7	Extr. l. anterior (15 mg)	4.3	10.1
E	♀	"	40	10.1	Sòso fisiológico	3.8	39.4
F	♀	"	20	1081	Extr. l. an,erior (10 mg)	6.1	21.8
G	♀	"	10	8.9	" " " (15 mg)	5.1	8.9
H	♀	"	10	9.8	" " " (20 mg)	5.3	12.1
I	♂	Castrados	7	14.7	Sôro fisiológico	4.0	43.1
J	♂	Castrados e Adrenoprivos	5	10.8	" "	—	61.0
K	♂	Castrados	8	12.7	Extr. l. anterior (15 mg)	7.1	17.1
L	♂	Castrados e Adrenoprivos	5	10.2	" " " (15 mg)	—	71.0
M	♀	" " "	4	10.0	Sôro fisiológico	—	54.3
N	♀	" " "	4	12.0	Extr. l. anterior (15 mg)	—	41.3

Os resultados, nos grupos de camundongos normais, mostram que em 248 dêles, pesando em média 10 g, não tratados, ou, então, injetados com sôro fisiológico, as adrenais pesaram, em média, 3.6 mg e o timo 36 mg. Dos 50 camundongos normais, 10 machos e 40 fêmeas, com pêso corporal médio de 9.6 g, tratados com extrato pré-hipofisário, as adrenais e o timo pesaram, respectivamente, 5 e 13 mg. Vê-se, pois, que o extrato empregado aumentou as adrenais e diminuiu o timo dos animais tratados. No grupo de machos castrados os efeitos da corticotropina sôbre as adrenais foram ainda mais pronunciados. A diminuição do pêso do timo como conseqüência do tratamento não foi observada nos animais adrenalectomizados, o que se interpreta por não ser direta a ação da corticotropina sôbre o timo.

Para se avaliar o efeito do tratamento dos camundongos castrados e adrenoprivos, reproduzimos na Tabela II a variação individual do pêso do timo. A diferença entre as médias registradas para os dois grupos, 61 ± 8 mg para os testemunhas e 71 ± 21 mg para os injetados com extrato, não é estatísticamente significativa. A corticotropina, por conseqüência, não modifica o pêso do timo na ausência da supra-renal.

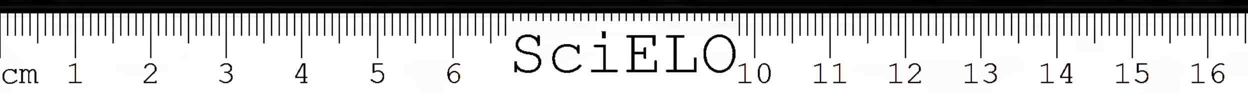
Tabela II

Camundongos castrados e adrenalectomizados

Nº	Pêso corp. (g)	Tratamento	Pêso do timo (mg)
2	11	0.25cm³ de sôro fisiológico, 2 vezes ao dia durante 4 dias.	51
3	11	"	69
7	11	"	60
11	11		69
13	10	"	56
9	10	0.25cm³ Extr. l. anterior 2 vezes ao dia durante 4 dias (Total 15 mg).	54
14	10	"	94
15	10	"	56
16	11	"	93
17	10	"	58

O fato da atrofia tímica se observar nos camundongos normais ou castrados, mas não nos adrenalectomizados, parece indicar que o extrato injetado atuou por intermédio da cortical da glândula supra-renal, como, aliás, já foi demonstrado em ratos infantis, entre outros, por Moon (7). Como já se conhece o efeito dos hormônios sexuais diminuindo o tamanho do timo (8), é provável que o aumento do hormônio cortical seja o responsável por aquela ação, subentendido que o hormônio cortical é tomado aqui na acepção de grupo dos hormônios esterólicos.

Do que ficou exposto é lícito concluir que o extrato de lobo anterior de hipófise bovina empregado nestas experiências: a) aumentou até de 50% o pêso das adrenais de camundongos infantis dos dois sexos e até de 80% o de machos castrados; b) diminuiu o pêso do timo em normais e castrados; c) não diminuiu o pêso do timo nos adrenoprivos, o que parece indicar ser o efeito precedente mediado pela cortex da adrenal.



RESUMO

Foram estudados os efeitos de uma preparação de lobo anterior de hipófise bovina sôbre as adrenais e o timo de camundongos infantis, registrando-se hipertrofia das adrenais e diminuição no tamanho do timo. Êste último efeito não foi observado em animais adrenalectomizados, o que sugere ser êle indireto, mediado pela cortex supra-renal.

ABSTRACT

Hypertrophy of adrenals and reduction in size of thymus in infantile mice were observed following the treatment with an alkaline extract of bovine anterior hypophysis. The thymotrophic effect was not obtained in adrenalectomized animals, therefore being mediated through the adrenal cortex.

The hypophyseal, adrenal and thymic relationships are discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. *Noble, R. & Collip, J.* (1941). Augmentation of pituitary cortico-trophic extracts and effect on adrenals, thymus and prepucial glands of rat. *Endocrinology*, 29, 93-95.
2. *Moon, H. & Crede, R.* (1940). Effect of adrenocorticotrophic hormone on the thymus of the rats. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 43, 44-46.
3. *Houssay, B. A., Del Castillo, E. B. & Pinto, A.* (1941). Acción de la suprarrenalectomia sobre el timo y los ganglios. *Rev. Soc. arg. Biol.*, 17, 26-39.
4. *Simpson, M., Li, Choch & Evans, H. M.* (1943). Bioassay of adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology*, 33, 261-268.
5. *Jores, A.* (1935). Die Bedeutung der Hypophyse für die Entstehung des Hochdruckes, insbesondere der essentiellen Hypertonie. *Klin. Wschr.*, 15, 841-846.
6. *Bates, R. W. & Riddle, O.* (1935). The preparations of prolactin. *J. Pharmacol.*, 55, 365-371.
7. *Moon, H.* (1940). Effect of adrenocorticotropic hormone on the thymus of 4 days old rats. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 43, 42-44.
8. *Chiodi, H.* (1940). The relationship between th thymus and the sexual organs. *Endocrinology*. 26, 107-116.

(Recebido para publicação em novembro de 1944).

NOTAS OFIOLÓGICAS

18. A posição do gênero *Rhadinaea* em sistemática (Continuação).

POR

ALCIDES PRADO

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Depois de me referir em trabalho anterior às espécies do gênero *Rhadinaea*, *Rh. affinis*, *Rh. poecilopogon* e *Rh. beui*, passo a redescrever *Rhadinaea occipitalis* (JAN), que, como as citadas, parece enquadrar-se nêsse mesmo gênero, por seus caracteres gerais, dentários e hemipênicos. Esta espécie ocorre em quase todo o Brasil e países limítrofes.

Rhadinaea occipitalis (JAN)

in Arch. Zool. Anat. Phys. 2:267.1863.

Dentes maxilares cêrca de 16, aumentados gradativamente de tamanho de diante para trás, separados dos dois últimos, pouco desonvolvidos, por um curto intervalo; dentes mandibulares subiguais.

Cabeça proporcionalmente alongada, não muito distinta do pescoço, com focinho arredondado; ôlho moderado, com pupila redonda. Corpo cilíndrico; escamas lisas, sem fossetas apicilares. Cauda moderada ou longa, com ponta afilada.

Rostral mais larga do que alta, apenas visível de cima; internasais mais largas do que longas, porém mais curtas do que as prefrontais; prefrontais também mais largas do que longas; frontal quase 2 vêzes tão longa quanto larga, mais longa do que sua distância da extremidade do focinho, mais curta do que as parietais; estas últimas tão longas quanto sua distância das internasais; loreal um pouco mais longa do que alta; 1 pré- e 2 postoculares; 1 + 2 temporais; 8 supralabiais, com 3ª, 4ª e 5ª junto ao ôlho; 4 infralabiais em contacto com a mental anterior, que é geralmente mais curta do que a posterior. Escamas em 15. Ventrais 160 a 194; anal dividida; subcaudais 55 a 81, pares.



Cauda aproximadamente entre um terço a um quinto do comprimento total. Pardo-olivácea, em cima, com duas séries de manchas arredondadas, negras, areoladas de claro e, por vêzes, confluentes sôbre o dorso; lados cinza-escuro; cabeça enegrecida, com um traço negro através dos olhos e uma estria clara, cantal, lateralmente; partes inferiores branco-amareladas, ornada de um ponto negro sôbre cada uma das extremidades das ventrais; labiais, mentais e gulares, quase sempre portadoras de vermiculações negras.

Hemipênis mais alongado do que em *Rh. affinis* e *Rh. poecilopogon*, capitato, não dividido, com cálices mais ou menos papilosos no ápice; sulco bífido; densamente crivado de espinhos na parte posterior, onde há três outros basilares, sendo um mais desenvolvido.

RESUMO

Nesta nota, redescreve-se a espécie *Rhadinaea occipitalis* (JAN), que ocorre em quase todo o Brasil e países limítrofes. Por seus caracteres gerais, dentários e hemipênicos, parece a mesma enquadrar-se no gênero *Rhadinaea*, como as demais estudadas em trabalho anterior.

ABSTRACT

In this paper the species *Rhadinaea occipitalis* (JAN) is redescribed. It occurs throughout Brazil and bordering countries. By its general characteristics, dental and hemipenic, it seems possible to place it in the genus *Rhadinaea*, together with other ones studied in anterior papers.

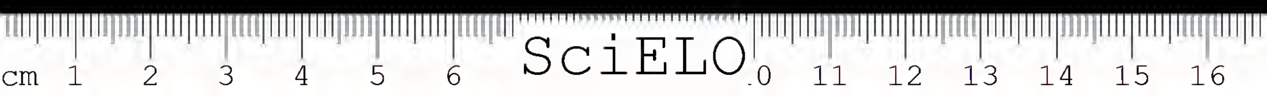
BIBLIOGRAFIA

Prado, A. (1943). Mem. Inst. Butantan, 17, 11-16.

(Entregue para publicação em 6 de março de 1944).

Rhadinaea occipitalis (JAN)

Espé-cimes Nos.	Procedencia	Sexo	E.	V.	A.	Subc.	Labiais		Oculares		Compr. em mm.	
							Supra	Infra j.m.a.	Pre	Post	Total	Cauda
8557	Santo André, S. Paulo . . .	♀	15-15-13	187	1/1	71/71	9/8	4	1	2	514	124
7539	Casa Brauca, S. Paulo . . .	♀	15-15-15	191	1/1	69/69	8	4	1	2	566	126
9119	Campo Limpo, S. Paulo . . .	♀	15-15-13	181	1/1	71/71	8	4	1	2	450	104
8855	S. José Campos, S. Paulo . .	♀	15-15-15	194	1/1	68/68	8	4	1	2	587	131
9395	Campinas, Goiás	♀	15-15-15	186	1/1	74/74	8	4	1	2	551	136
1793	Pelotas, R. G. do Sul . . .	♀	15-15-13	187	1/1	59/59	8	4	1	2	535	91
1418	Capital, S. Paulo	♂	15-15-13	175	1/1	81/81	8	4	1	2	428	122
501	Terezina, Piauí	♀	15-15-15	172	1/1	71/71	8	4	1	2	320	80
1794	Pelotas, R. G. do Sul . . .	♀	15-15-15	179	1/1	75/75	8	4	1	2	430	96
184	Anápolis, S. Paulo	♂	15-15-15	175	1/1	77/77	8	4	1	2	515	129
4307	Caçapava, S. Paulo	♀	15-15-15	191	1/1	55/55	7/8	4	1	2	572	110
1327	Butantan, S. Paulo	♂	15-15-13	176	1/1	67/67	8	4	1	2	538	132
9996	Rocinha, S. Paulo	♀	15-15-15	177	1/1	71/71	8	4	1	2	435	106
10021	Aimorés, S. Paulo	♀	15-15-15	181	1/1	71/71	8	4	1	2	465	115
10218	Tambaú, S. Paulo	♀	15-15-15	179	1/1	71/71	8	4	1	2	569	154
1246	? , Ceará . . .	♂	15-15-13	169	1/1	69/69	8/7	4	1	2	417	112
9533	Capital, S. Paulo	♀	15-15-15	180	1/1	68/68	8	4	1	2	506	117
4306	Caçapava, S. Paulo	♀	15-15-15	194	1/1	66/66	8	4	1	2	549	121
1403	? , Bahia . . .	♀	15-15-15	160	1/1	71/71	8	4	1	2	371	100
1404	? , Bahia . . .	♂	15-15-15	161	1/1	74/74	8	4	1	2	395	116
7873	Butantan, S. Paulo	♀	15-15-15	185	1/1	73/73	8	4	1	2	231	53
436	Butantan, S. Paulo	♀	15-15-13	187	1/1	73/73	8	4	1	2	541	133
9258	Roxo Roiz, Paraná	♀	15-15-15	184	1/1	69/69	8	4	1	2	475	114
569	Terezina, Paiuí	♀	15-15-15	175	1/1	75/75	8	4	1	2	428	115
8734	Campinas, Goiás	♀	15-15-15	184	1/1	73/73	8	4	1	2	505	121
1241	Capital, S. Paulo	♂	15-15-13	177	1/1	73/73	8	4	1	2	421	107
6199	Capital, S. Paulo	♂	15-15-15	179	1/1	77/77	8	4	1	2	468	120
183	Butantan, S. Paulo	♀	15-15-15	181	1/1	75/75	8	4	1	2	346	85
526	Butantan, S. Paulo	♀	15-15-13	187	1/1	71/71	8	4	1	2	508	118
7186	Rincão, S. Paulo	♀	15-15-13	188	1/1	69/69	8	4	1	2	491	116
1242	Capital, S. Paulo	♀	15-15-15	181	1/1	71/71	8	4	1	2	404	98
9753	Orlândia, S. Paulo	♀	15-15-15	184	1/1	68/68	8	4	1	2	555	128
6714	Pinda, S. Paulo	♀	15-15-13	179	1/1	75/75	8	4	1	2	544	140
8343	C. Cesar, S. Paulo	♀	15-15-13	180	1/1	69/69	8	4	1	2	505	125
10427	C. Largo, S. Paulo	♀	15-15-15	179	1/1	65/65	8	4	1	2	420	94
7543	S. Bernardo, S. Paulo . . .	♂	15-15-13	179	1/1	69/69	8	4	1	2	402	96
9100	Campo Limpo, S. Paulo . .	♂	15-15-13	175	1/1	79/79	8	4	1	2	538	142
5204	C. do Pinhal, S. Paulo . . .	♀	15-15-15	183	1/1	73/73	8	4	1	2	469	117
8337	Campo Limpo, S. Paulo . . .	♂	15-15-13	181	1/1	81/81	8	4	1	2	443	120
9442	Campo Limpo S. Paulo . . .	♀	15-15-15	189	1/1	71/71	8	4	1	2	502	122
9763	Jacaré, S. Paulo	♀	15-15-13	180	1/1	79/79	8	4	1	2	425	114


SciELO

NOTAS OFIOLÓGICAS

19. *Atractus* da Colômbia, com a redescrição de três novas espécies.

POR

ALCIDES PRADO

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

De um lote de serpentes, enviado da Colômbia, em 1943, pelo revmo. Hermano Daniel, do Colégio de San José, de Medellin, duas espécies se destacaram, sendo as mesmas aqui redescritas. No mesmo ano, de outro lote, remetido pelo revmo. Hermano Niceforo Maria, do Instituto de La Salle, de Bogotá, foi possível descrever-se mais uma como nova, que agora é aqui também redescrita.

Atractus andinus PRADO

♀ — Focinho arredondado. Rostral mais larga do que alta, pouco visível de cima; internasais pequenas, tão largas quanto longas; prefrontais grandes, também tão largas quanto longas; frontal mais larga do que longa, mais curta do que sua distância da extremidade do focinho; loreal 2 vêzes tão longa quanto alta; 2 postoculares; 1 + 2 temporais; 7 supralabiais, com 3ª e 4ª junto ao ôlho; 3 infralabiais em contacto com a mental. Escamas lisas, sem fossetas apicilares, em 17; ventrais 174; anal inteira; subcaudais 37/37.

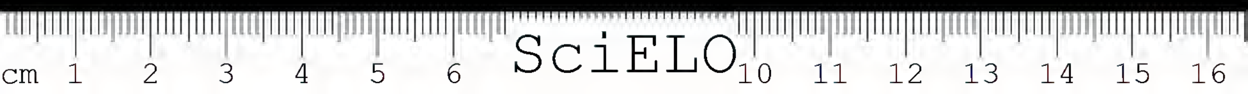
Pardacenta em cima, com u'a linha negra vertebral, orlada de manchas arredondadas, da mesma côr, em toda extensão, paravertebrais; pontilhados negros paraventrais, formando como que uma listra longitudinal, de cada lado; cabeça enegrecida, porém desmaiada nas têmporas; lábios e partes inferiores manchados de pardo-negro.

Comprimento total 287 mm; cauda 37 mm.

Holotipo, adulto ♀, sob o No. 231, na coleção do Colégio de San José, de Medellin, Colômbia.

Procedência: Andes.

Afim de *Atractus maculatus* (GÜNTHER), do qual se distingue pelo número de ventrais e subcaudais e pelo colorido geral.



Atractus sanguineus Prado

♂ — Focinho arredondado. Rostral cêrca de 2 vêzes tão larga quanto alta, pouco visível de cima; internasais pequenas, tão largas quanto longas; prefrontais grandes, também tão largas quanto longas; frontal pouco mais larga do que longa, mais curta do que sua distância da extremidade do focinho; loreal cêrca de 3 vêzes tão longa quanto alta; 2 postoculares; 1 + 2 temporais; 7 supralabiais, com 3ª e 4ª junto ao ôlho; 3 infralabiais em contacto com a mental; Escamas lisas, sem fossetas apicilares, em 17; ventrais 179; anal inteira; subcaudais 43/43.

Vermelho-sanguínea em cima, onde sôbre a linha mediana corre um traço negro, ladeado em toda extensão por manchas arredondadas da mesma côr, para-vertebrais; cabeça enegrecida; partes inferiores branco-amareladas, salpicadas de pardo-negro.

Comprimento total 424 mm; cauda 58 mm.

Holotipo, adulto ♂, sob o No. 232, na coleção do Colégio de San José, de Medellin, Colômbia.

Procedência: Yarumal (N. de Medellin).

Próxima à anterior, da qual se separa por um número ainda mais elevado de ventrais e subcaudais, pelo alongamento da loreal e pelo colorido geral.

Atractus wagleri Prado

♀ — Focinho arredondado. Rostral pouco mais larga do que alta, apenas visível de cima; internasais muito pequenas, tão largas quanto longas; prefrontais muito grandes, tão largas quanto longas; frontal tão larga quanto longa, pouco mais longa do que sua distância da extremidade do focinho; loreal 2 vêzes tão longa quanto alta; 2 postoculares; 1 + 2 temporais; 7 supralabiais, com a 3ª e 4ª junto ao ôlho; 3 infralabiais em contacto com a mental. Escamas lisas, sem fossetas apicilares em 17-17-17; ventrais 174; anal inteira; subcaudais 43/43.

Avermelhada em cima, com faixas transversais e irregulares sôbre o dorso, flanqueadas por outras menores, alternadas; cabeça enegrecida; ventre pardo-negro.

Comprimento total 411 mm; cauda 56 mm.

Holotipo, adulto ♀, sob o No. 228, no museu do Instituto de La Salle, de Bogotá, Colômbia.

Procedência: Humbo (Boyacá).

Afim de *Atractus sanguineus*, do qual se distingue pelos seguintes caracteres: pela rostral que é pouco mais larga do que alta e não 2 vêzes tão larga quanto

alta; pela frontal que é tão larga quanto longa e não pouco mais larga do que longa; pela loreal que é 2 vêzes mais longa do que alta e não três vêzes; e, finalmente, pelas variações de colorido.

O nome desta espécie foi dedicado à memória de JEAN WAGLER, conhecido naturalista. e criador do gênero *Atractus*.

RESUMO

Redescrevem-se os *Atractus andinus* PRADO e *Atractus sanguineus* PRADO, procedentes, respectivamente, de Andes e Yarumal, na Colômbia, e posteriormente *Atractus wagleri* PRADO, próxima à segunda daquelas, e proveniente de Humbo (Boyacá), no mesmo país.

ABSTRACT

Atractus andinus PRADO and *Atractus sanguineus* PRADO, provenient respectively from the Andes and Yarumal, in Colombia, are redescribed, followed by *Atractus wagleri* PRADO, which resembles the latter and came from Humbo (Boyacá), in the same country.

BIBLIOGRAFIA

Boulenger, G. A. (1894). Cat. Sn. Brit. Mus., 2:306.
Prado, A. (1944). Ciência (México), 5(4-5):111.
Prado, A. (1945). Ciência (México), 6(2):61.

(Recebido para publicação em 6 de março de 1944).


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XVIII — 1944-45



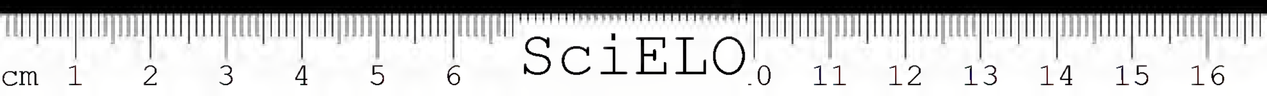
Atractus andinus Prado



Atractus sanguineus Prado



Atractus wagleri Prado


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

ENSAIOS TERAPÊUTICOS COM A PENICILINA PREPARADA NO INSTITUTO BUTANTAN (*)

POR

F. PRADO JR., A. TABORDA & L. C. TABORDA

(Dos Laboratórios de Contrôle e de Química do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

No presente trabalho referimos as observações clínicas pormenorizadas de seis casos graves tratados com a penicilina preparada no Instituto Butantan.(**) Foi nosso objetivo verificar a atividade terapêutica do produto fabricado em pequena escala, afim de assentar uma base segura para eventualmente empreender o preparo da penicilina em escala industrial.

Em virtude do fato de dispormos apenas de uma produção limitada, reservamos o emprêgo da penicilina por nós preparada a casos extremamente graves, em que, por já haverem falhado outros recursos terapêuticos, bem pudessemos avaliar da eficácia do nosso.

MATERIAL E MÉTODOS

A penicilina obtida e purificada em Butantan, sob a forma de sal de bário, foi dissolvida em sôro glicosado isotônico, de maneira a dar uma concentração de 600 a 2000 unidades Oxford por centímetro cúbico e empregada pelas vias venosa, intramuscular ou subcutânea. Para aplicação local usamos quer uma solução de sal de bário contendo 100 u. O. por centímetro cúbico ou o próprio caldo de cultura do cogumelo, dosando 20 u. O. por cm^3, com o fim de economizar o sal, que ficava reservado para as injeções.

A quantidade total de unidades administrada variou de um caso a outro, oscilando entre 30 000 e 200 000 u. O. em 24 horas. Doses adequadas para determinadas infecções mostraram-se completamente ineficázes para outras.

(*) Trabalho auxiliado por uma subvenção dos Fundos Universitários de Pesquisas.

(**) As pesquisas relativas às condições de preparo e aos ensaios de produção semi-industrial de penicilina foram comunicados à Associação de Quimica do Brasil na sessão de 15 de novembro de 1943, por TABORDA, TABORDA & PRADO JR..



O tratamento foi sempre iniciado por meio de injeções venosas, pois todos os casos eram de natureza grave e de prognóstico reservado. O sal de bário era dissolvido em 250 cm³ de sôro glicosado isotônico e administrado gota a gota na veia, seguido de outras doses no músculo ou na veia em intervalos regulares de 4 horas, dia e noite, afim de manter uma concentração suficiente de penicilina no sangue, compensando a rápida eliminação urinária do medicamento.

As injeções venosas foram sempre de uma tolerância perfeita, ao passo que as injeções intramusculares produziram, em certos doentes, dôr viva local, especialmente si as injeções eram feitas em regiões próximas.

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

1. *Infecção puerperal* — M. J. R., brasileira, 24 anos, casada, preta, doméstica.

Histórico — Parto normal, realizado no Hospital Municipal em 23-1-44. Primigesta. Um ponto de sutura no períneo. Alta em 27-1-44. No dia 9 de fevereiro deu entrada novamente no Hospital, queixando-se de dôr no baixo ventre, temperatura de 39°C e 160 pulsações por minuto. Apresentava defesa abdominal e supuração do ponto cirúrgico do períneo. A doente informou ter realizado lavagens vaginais (sic).

Diagnóstico — Endometrite. Parametrite puerperal. Septicemia (Dr. Milton Olinto de Arruda).

Tratamento — Cibazol (1 comprimido de 3 em 3 horas). Soluseptazine (1 empôla diariamente na veia). Cardiazol e efedrina.

10-2-44 — Temperatura 38°C. Pulso, 140. Defesa abdominal. Vômitos. Cibazol e Soluseptazine. Gêlo no baixo ventre e poção de Rivière.

11-2-44 — Temp. 39.8°C, pulso, 142. Transfusão de 10 cm³ de sangue. Veritol (1 empôla cada 4 horas). Coramina e vitamina C (500 mg). Cibazol e Soluseptazine.

12-2-44 — Temp. 37.8°C, pulso 64. Estado geral ruim. Veritol, Coramina, Necroton. 250 cm³ de sôro glicosado isotônico. Cibazol e Soluseptazine.

13-2-44 — Temp. 38°C, pulso 120 (pela manhã). Transfusão de 150 cm³ de sangue. 250 cm³ de sôro glico-fisiológico. Veritol, Cibazol e Soluseptazine. Às 20 horas a doente tinha o seu estado agravado, entrando em colapso periférico. Temp. 35.2°C, pulso filiforme, incontável. Suspendeu-se a administração de sulfamídicos e iniciou-se o tratamento pela penicilina. 50 000 unidades Oxford dissolvidas em 250 cm³ de sôro glicosado a 5%, em transfusão contínua na veia. Após uma hora de transfusão contínua, foram administradas mais 50 000 unidades dissolvidas em 250 cm³ de sôro glicosado isotônico em transfusão contínua no músculo.

14-2-44 — Às 2 horas, 50 000 unidades em 250 cm³ de sôro glicosado, por via subcutânea. Às 10 horas, 10 000 unidades na veia. Temp. 36.4°C, pulso 120. Às 15 horas, 20 000 unidades na veia. Às 19 e às 23 horas, 10 000 unidades.

15-2-44 — Temp. 36.5°C, pulso 100. Transfusão de 100 cm³ de sangue. Às 3, 7 e 16 horas, 10 000 unidades de penicilina. Às 20 horas, 12 000 unidades, sendo 10 000 em 250 cm³ de sôro glicosado na veia e 2 000 no músculo. Às 23 horas, 10 000 unidades por via muscular.

16-2-44 — Temp. 37.2°C, pulso 120. Às 4 e 8 horas, 10 000 unidades por via muscular. Às 16, 20 e 23 horas, 2 000 unidades por via muscular.

17-2-44 — Temp. 37.7°C, pulso 110. Às 4, 8, 12 e 15 horas, 1 500 unidades por via muscular. Às 23 horas, 1 500 unidades por via muscular e 3 000 unidades dissolvidas em 250 cm³ de sôro glicosado, por via subcutânea.

18-2-44 — Temp. 37.2°C, pulso 120. A começar das 4 horas até 24 horas, 1 500 unidades por via muscular de 4 em 4 horas.

19-2-44 — Temp. 37°C, pulso 100. A mesma dose de penicilina do dia anterior.

20-2-44 — Temp. 37.2°C, pulso 110. Suspendeu-se a administração da penicilina. Não recebeu outra medicação qualquer.

21-2-44 — Temp. 36.2°C, pulso 84. Sôro glicosado e vitamina C.

22-2-44 — Temp. 37.2°C, pulso 94. Macissez na base do pulmão direito.

Diagnosticada uma basite de decúbito. Cálcio e vitamina C. Extrato de fígado. Sôro glicosado hipertônico.

23-2-44 — Temp. 37.5°C, pulso 82. Mesma medicação do dia anterior.

24-2-44 — Temp. 38°C, pulso 100. *Radiografia dos pulmões*: opacidade da base direita, com apagamento do seio costo-diafragmático (Dr. Rafael de Lima Filho). Gluconato de cálcio e vitamina C. Anemotrat forte.

No dia 28, a paciente não apresentava febre, começando a levantar-se do leito, fazendo pequenos exercícios diários. A medicação pelo cálcio e vitamina C prolongou-se até o dia 5-3-44. Recebeu alta em 6-3-44.

Exames de laboratório — *Exame de fêzes* (em 12-2-44): raros ovos de *Ascaris*.

Tipo sanguíneo: 1 (Moss).

Hemocultura (18-2-44): negativa, após ter recebido 286 000 unidades Oxford de penicilina.

Hemograma (3-3-44) (Dr. Gustavo Fleury da Silveira Filho):

	leucocitos por mm³	4.700
neutrófilos	segmentados	82%
	bastonetes	1%
	metamielocitos	0%
	eosinófilos	0%
	basófilos	0%
	monócitos	2%
	linfocitos	15%

Reações pela penicilina — Gôsto metálico após as injeções endovenosas. Dôr local após aplicação muscular e subcutânea.

UNIDADES ADMINISTRADAS — 306 500 unidades Oxford por via parenteral.



2. *Infecção estafilocócica* — J. C., brasileira, 34 anos, casada, branca, doméstica.

Histórico — Deu entrada no Instituto Paulista em 25-2-44 com elevação térmica, acusando dôres abdominais. Abscesso do fundo de saco de Douglas operado pelo Dr. Luiz do Rego.

Depois da colpotomia a temperatura se manteve oscilante, razão pela qual, decorridos 10 dias, foi feita nova intervenção cirúrgica com dilatação do orifício de drenagem. Como continuasse a supuração e a febre, em 10 de março foi realizada uma laparatomia, tendo sido constatado um quisto hemático supurado do ovário esquerdo. Retirada do quisto e drenagem da parede e do fundo de saco. A temperatura continuou oscilante, alcançando, por vêzes, 40.3°C. Estado geral ruim.

Diagnóstico — Quisto hemático supurado do ovário esquerdo (Dr. A. Luiz do Rego).

Tratamento — Transfusões de sangue de 500 cm³. Albucid, Anaseptil a 25% na veia (3 empôlas diárias). Como o estado da doente piorasse dia a dia, iniciamos o tratamento pela penicilina, após suspender a administração de sulfamídicos.

Com a aplicação de 20 000 unidades Oxford dissolvidas em 250 cm³ de sôro glicosado isotônico e administradas gota a gota na veia, a temperatura da paciente, que era de 40.3°C, caiu para 36.5°C. Diariamente foi administrada a penicilina em transfusão contínua durante 2 horas, seguida de aplicações intermitentes de outras doses de 4 em 4 horas, dia e noite. No terceiro dia de tratamento foram administradas 30 000 unidades em transfusão contínua e 10 000 unidades de 4 em 4 horas. Ao tratamento geral associou-se o local, injetando-se pelos drenos caldo de cultivo de *P. notatum* dosando 20 unidades Oxford por centímetro cúbico. A febre caiu e permaneceu estável, notando-se grande melhoria do estado geral da paciente. Desaparecimento quase completo da supuração pelos drenos. Conjuntamente com o tratamento pela penicilina, continuou-se a administração de vitamina C, sôro glicosado e transfusões de sangue de 250 cm³ em dias alternados.

Decorridos 7 dias, sobreveiu nova elevação térmica, concomitantemente com aumento da supuração pelos drenos, a despeito do tratamento pela penicilina estar em curso. Dado o cheiro característico do pús, suspeitou-se de uma infecção secundária por *E. coli*, para a qual a penicilina é inativa. A cultura do pús revelou a presença de bacilos Gram-negativos, morfologicamente idênticos à *E. coli*. A administração da penicilina foi suspensa, iniciando-se a aplicação de Anaseptil a 25% (uma empôla diária). Em poucos dias a febre cedeu, desapareceu a supuração e a doente teve alta em 12 de abril.

Exames de laboratório — *Hemocultura* (9-3-44): negativa.

Hemograma (9-3-44):

	leucócitos por mm³	13.900
neutrófilos	mielocitos	0%
	metamielocitos	1%
	núcleo em bastonetes	31%
	núcleo segmentado	44%
	eosinófilos	0%
	basófilos	0%
	linfocitos	14%
	monocitos	9%
	plasmocitos	1%

Conclusões — Processo infeccioso agudo, inflamatório, ligeiramente exsudativo, provavelmente da mucosa. Boa defesa. Não há caractéres hematológicos de especialidade de qualquer natureza (Laboratório de análises clínicas dos Drs. Felipe de Vasconcellos e Gastão Rosenfeld).

Cultura do pús (15-3-44) — Estafilococos.

Cultura do pús (21-3-44) — Bacilos Gram-negativos morfologicamente semelhantes à *E. coli*.

Reações pela penicilina — Durante as transfusões contínuas havia náuseas e, por vêzes, vômitos. Gôsto metálico durante as aplicações na veia. Dôr local nas aplicações musculares.

UNIDADES ADMINISTRADAS — 255 000 unidades Oxford em injeção e 6 000 unidades localmente.

3. *Infecção por Staphylococcus aureus* — E. M., brasileira, 31 anos, branca, doméstica.

Histórico — Período de gravidez normal. Constatado um granuloma no 2.° molar superior esquerdo no 5.° mês de gravidez. Em novembro de 1943, decorridos 5 dias *post partum*, formou-se um abcesso no seio direito, acompanhado de febre. Aplicou cataplasmas de linhaça localmente e uma empôla diária de Anaseptil durante 5 dias. O abcesso foi aberto, com saida de pús espêsso, amarelado. Reaparecimento de novos abcessos dos dois seios, que foram também abertos. Durante 30 dias a supuração dêsses fócos continuou, acompanhada de elevação térmica, a despeito do tratamento pelo sulfamídico.

Tratamento — Sulfanilvacin, Pioloco e água oxigenada localmente. Um comprimido de Sulfadiazine de 4 em 4 horas (20 comprimidos). 9 empôlas de Pioformine. Formação de novos abcessos. Foram prescritos mais 20 comprimidos de Tiazamida. Durante 5 dias foi administrado 1 empôla diária de Soluseptazine na veia. A supuração dos fócos persistia, acompanhada de febre. Glicemia de 2 g por ml. Aplicação diária de 20 unidades de insulina em duas doses. Necroton. Saiu do hospital com 5 fócos supurativos em ambos os seios. Início de erisipela na perna direita. Tomou mais 10 empôlas de Soluseptazine e 20 comprimidos de Septazine, sem resultado. Propidon. Febre atingindo por vêzes 39°C. Estado geral ruim. Grande prostação.

Em 16 de fevereiro iniciou-se o tratamento pela penicilina localmente, suspendendo-se toda a medicação sulfamídica. O tratamento inicial consistiu em aplicação local de uma solução isotônica do sal de bário de penicilina, dosando 100 unidades Oxford por cm^3. Irrigações contínuas dos fócos supurativos (Carrel) durante 4 dias. Diminuição acentuada da supuração, que se tornou mais flúida. Desaparecimento da febre. Como o processo evoluisse para a cura, a solução isotônica do sal de bário foi substituida por filtrado de cultivo de *Penicillium notatum*, dosando 20 unidades Oxford por cm^3. Desaparecimento completo da secreção e tendência à cicatrização. Início de erisipela na perna direita com elevação térmica. Aplicação da penicilina injetável na dose de 5 000 unidades de 4 em 4 dias. Com 20 000 unidades injetáveis e aplicação local do filtrado na perna, a temperatura baixou, regredindo os sintomas erisipelóides.



Durante o tratamento pela penicilina continuou-se a administração de insulina. Em 10 de março suspendeu-se todo tratamento, pois o estado da paciente era bom, tendo desaparecido a glicosúria e cicatrizado os fócos. Extração do dente com granuloma. A paciente ficou sob observação clinica durante três meses, estando completamente curada.

Exames de laboratório — A cultura do pús revelou o crescimento de cocos Gram-positivos, com comportamento biológico semelhante ao *Staphylococcus aureus*. A hemocultura antes do tratamento pela penicilina foi negativa.

Dosagem de glicose no sangue: 2 g por mil.

Reações pela penicilina — Não apesentou.

UNIDADES ADMINISTRADAS — 20 000 unidades Oxford em injeção e 45 000 unidades localmente.

4. *Infecção estreptocócica* — H. A. P., brasileiro, 31 anos, casado, branco, médico-veterinário.

Histórico — Deu entrada no Hospital Oswaldo Cruz com uma inflamação do artelho médio do pé esquerdo. Pequena ulceração interdigital e fortes dores, que excediam qualquer limite de suportabilidade. O artelho se apresentava escuro e o pé edemaciado com algumas placas vermelhas, luzidias e quentes. Temperatura inferior a 35°C e pulso filiforme, atingindo a 150 pulsações por minuto. Estado geral ruim.

Diagnóstico — Infecção estreptocócica do artelho (Dr. Quirino Pucca).

Tratamento — Medicação contra a dôr, aplicando-se ao todo, 8 centigramos de morfina, para conseguir aliviar o paciente. Tonicardíacos e glicose a 50% na veia. Seis empôlas de Anaseptil a 25% na veia, sem melhora. Líquido avermelhado, saindo do artelho. Como o estado do paciente se agravava, suspendeu-se a administração do sulfamídico e iniciou-se a aplicação local da penicilina. Um filtrado de cultivo de *P. notatum*, dosando 20 unidades Oxford por cm^3, foi aplicado localmente em compressas, renovadas cada 15 minutos, dia e noite. Decorridas 12 horas da aplicação local, notou-se a diminuição da dôr, pé menos edemaciado, melhoria do estado geral. Iniciou-se a aplicação do sal de bário por via parenteral, na dose de 10 000 unidades Oxford de 4 em 4 horas. Como o paciente se queixasse de dôr nas aplicações por via muscular, passou-se a administrar a penicilina na veia, dissolvida em sôro glicosado hipertônico. Com a aplicação de 70 000 unidades injetáveis e 15 200 localmente o paciente teve alta do Hospital.

Reações pela penicilina — Após a segunda dose injetável de penicilina manifestou-se um surto de urticária, que cedeu com medicação pela adrenalina, cálcio e Necroton. Gôsto metálico nas injeções endovenosas. Rubor das faces. Dôr nas aplicações intramusculares.

UNIDADES ADMINISTRADAS — 70 000 unidades Oxford em injeção e 15 200 unidades localmente.

5. M. M. C., brasileiro, 16 anos, solteiro, branco.

Histórico — Queixava-se de cefaléias intensas, que cediam com analgésicos. Decorridos 4 dias apresentou edema inflamatório nas pálpebras do olho esquerdo. Diariamente apresentava febre. Internado no Hospital Municipal, em 25-1-44. Temperatura

37.5°C. *Radiografia*: Opacidade dos seios frontais, cujos limites são indistintos, fazendo suspeitar de um processo de osteite peri-sinusal (Dr. Rafael de Lima F.°). Hemocultura negativa.

Diagnóstico — Sinusite frontal aguda — osteomielite do frontal (Drs. A. Perella e Cassio M. Alves).

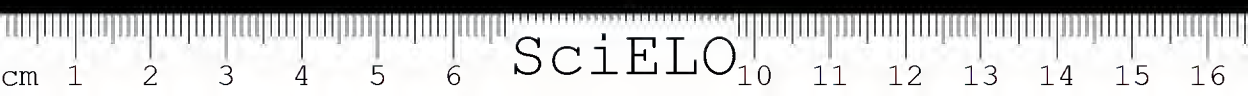
Tratamento — Durante oito dias tomou um comprimido e meio de Cibazol de 4 em 4 horas, dia e noite. Diariamente glicose na veia a 50% e Necroton. Vacina antistafilocócica "Pinheiros". Transfusões de sangue. *Radiografia* em 9-2-44: o estudo comparativo com a radiografia anterior demonstra agravação do processo de osteomielite do frontal, o qual, partindo dos limites do seio frontal esquerdo, atinge já a bossa frontal esquerda: observa-se um processo de osteoclasia, com perda da estrutura. Os limites externos e superiores do seio frontal acham-se desaparecidos (Dr. Rafael de Lima F.°).

O paciente apresentava um tumor com flutuação na região frontal esquerda; abertura do seio frontal. Transfusões de sangue diariamente, glicose hipertônica e curativos locais. *Radiografia* em 26-2-44: não houve modificação do aspecto radiológico do processo de osteomielite frontal (Dr. Rafael de Lima F.°). Foi iniciado o tratamento pela penicilina pelo método de transfusão contínua na veia. No 1.° dia foram administradas 90 000 U. Oxford, sendo 40 000 gôta a gôta na veia e 10 000 u.O. de 4 em 4 horas; localmente foram aplicadas 5 000 u.O. da solução do sal de bário. Nos três dias subseqüentes o paciente recebeu 40 000 unidades Oxford em 24 horas, sendo 12 000 u.O. gôta a gôta na veia e 4 000 u.O. de 4 em 4 horas. Foi aplicada diàriamente 2 400 u.O. localmente. Com quatro dias de tratamento, desaparecimento da supuração e da febre. Em 22-3-44, após a aplicação de 403 000 u.O. por via parenteral e 31 400 u.O. localente, foi feita nova *radiografia*: o estudo comparativo com o exame anterior demonstra maior delimitação do processo destrutivo, o qual não se extendeu, sendo, entretanto, mais intenso (Dr. Rafael de Lima F.°).

A dose de penicilina foi sendo reduzida até completar 30 dias de tratamento. Nos últimos dias a dose de penicilina administrada em 24 horas era de 10 000 u.O. por via parenteral e 1 200 localmente. *Radiografia* em 3-4-44: o estudo comparativo com o exame anterior demonstra boa delimitação do processo e menor grau de destruição nos bordos, notando-se zonas de neo-formação óssea, no centro da zona de destruição (Dr. Rafael de Lima F.°). Decorridos três dias após o término do tratamento pela penicilina, foi feita outra *radiografia*: o estudo comparativo com as radiografias anteriores demonstra evolução favorável, acentuando-se a reconstituição óssea e redução da zona de osteoclasia, restabelecendo-se a nitidez dos limites do seio frontal esquerdo (Dr. Rafael de Lima F.°). O paciente teve alta no hospital, ficando em observação, sem qualquer tratamento clínico. *Radiografia* em 24-4-44: o estudo comparativo com o exame anterior demonstra nítida reparação do tecido ósseo, sendo atualmente difícil estabelecer os primitivos limites da lesão, reduzida a uma zona de desmineralização discreta (Dr. Rafael de Lima F.°). O paciente ficou em observação durante 9 meses, estando aparentemente curado.

Exames de laboratório — Reações de Wassermann, Kline e Kahn (1-2-44) negativas.

7



Tipo sanguíneo — II (Moss).
Hemoculturas (26-1-; 10-3; 16-3) — negativas.
Culturas do pús — *Staphylococcus aureus.*
Hemogramas (Dr. Gustavo Fleury da Silveira F.º):

		13-2-44	17-3-944	29-3-44	13-4-44
	hemoglobina ..		67 %	73 %	75 %
	eritrocitos.....		5.010.000	5.210.000	4.630.000
	leucocitos	12.500	9.800	7.800	6.550
	valor globular.	=	0.67	0.75	0.81
neutrófilos	segmentados ..	45 %	51 %	43 %	46 %.
neutrófilos	bastonetes	1 %	1 %	0 5 %	1 %
neutrófilos	metamielocitos.	0 %	0 %	0 %	0 %
	eosinófilos	4 %	11 %	6.5 %	7 %
	bãsófilos	1 %	0 %	0.5 %	1 %
	monocitos	1 %	1 %	0.5 %	1 %
	linfocitos	48 %	36 %	49 %	44 %

Reações pela penicilina — Dôr local nas aplicações intramusculares. Gôsto metálico nas aplicações na veia.

UNIDADES ADMINISTRADAS — 563 000 unidades Oxford por via parenteral e 44 000 unidades localmente da solução do sal de bário.

6. *Infecção estafilocócica* — A. C., italiana, 50 anos, viuva, branca, doméstica.

Histórico — Deu entrada no Hospital N. S. Aparecida com abcesso no calcanhar e parte plantar do pé direito. Abertura dos abcessos e drenagem. Supuração intensa e difícil cicatrização. Temperatura atingida 38°C. Há 5 meses teve nefrite e furunculose. Diabética.

Diagnóstico — Flegmão do pé direito.

Tratamento — Curativos diários com éter e 20 unidades de insulina localmente. Três comprimidos diários de Cibazol durante 7 dias. 40 unidades de insulina diariamente por via parenteral. Radioterapia. Supuração intensa e perna edemaciada. Decorridos 30 dias de hospitalização, os fócos sépticos continuavam ativos. Suspendeu-se a administração do sulfamídico e iniciou-se o tratamento local pela penicilina, juntamente com a aplicação de insulina localmente e em injeção. A penicilina foi aplicada em compressas e irrigações dos fócos supurativos, usando-se, para isso, um filtrado de cultivo de *Penicillium*, dosando 30 unidades Oxford por cm³. Nos primeiros cinco dias de tratamento foram aplicadas localmente 5 000 unidades, com diminuição da supuração e da dôr, seguida da aplicação de mais 3 000 unidades diárias. Com 30 dias de tratamento desapareceu completamente a supuração, cicatrizando os fócos. A paciente teve alta em 2-5-44.

Exames de laboratório — *Exame de urina* (25-2-44): 26-20 g de glicose por litro; (6-3-44): 33.10 g por litro. *Exame de sangue* (29-3-44): 2.80 g de glicose por mil. *Exame de pús*: *Staphylococcus*.

UNIDADES ADMINISTRADAS — 100 000 unidades Oxford localmente.

COMENTÁRIOS

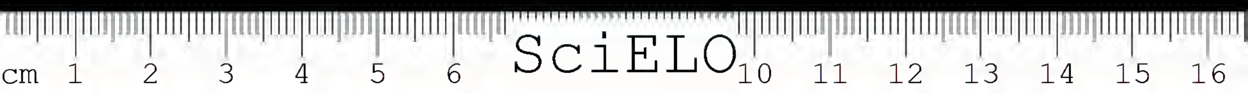
Da análise dos casos clínicos por nós tratados com penicilina, vê-se que o tempo de duração do tratamento variou de 4 a 30 dias, notando-se, logo às primeiras doses, melhoria dos sintomas mórbidos. Assim é que, no caso da infecção puerperal, a paciente já se encontrava em estado de colapso periférico, sem que se tivesse obtido qualquer resultado pela administração precóce de sulfamídicos. Com a aplicação de 150 000 unidades Oxford de penicilina, as primeiras 14 horas evidenciou-se acentuada melhora do estado geral da paciente. Pouco a pouco, com as doses elevadas, que a gravidade do caso requeria, a infecção foi sendo debelada. Após alguns dias de apirexia, foi observada nova elevação térmica, atribuida a uma basite de decúbito, comprova radiológicamente, a qual cedeu com o tratamento pelo cálcio, extrato de fígado e vitamina C.

Apesar de não ter sido realizada a hemocultura antes do tratamento pela penicilina, o que nesse caso seria de inestimável valor, tal falha não nos impede de apreciar a sua rápida ação na infecção, pois todos os recursos terapêuticos já se haviam esgotados. Após a administração de 286 000 unidades de penicilina, a nosso pedido, foi realizada uma hemocultura, com resultado negativo, o que já era de prever, pois geralmente conseguem se hemoculturas negativas com 100 000 unidades de penicilina. Clinicamente, foi diagnosticado pelo médico assistente como sendo um caso de septicemia puerperal.

A administração da penicilina deve ser feita por um período bastante longo, até que o processo infeccioso mostre evidência de regressão e a temperatura haja voltado ao normal. Depois de vários dias de tratamento intenso, associado com a melhoria clínica, a dose da droga pode reduzir-se gradualmente até que os sinais clínicos sugiram que o paciente esteja capacitado para defender-se com seus recursos naturais; então suspende-se a sua administração (1).

Quadro I reproduz a curva térmica referente ao caso citado, mostrando a dose grande de penicilina administrada nas primeiras 24 horas, dada a natureza grave da infecção, para depois, pouco a pouco, ir diminuindo, à medida que a temperatura se normalizava.

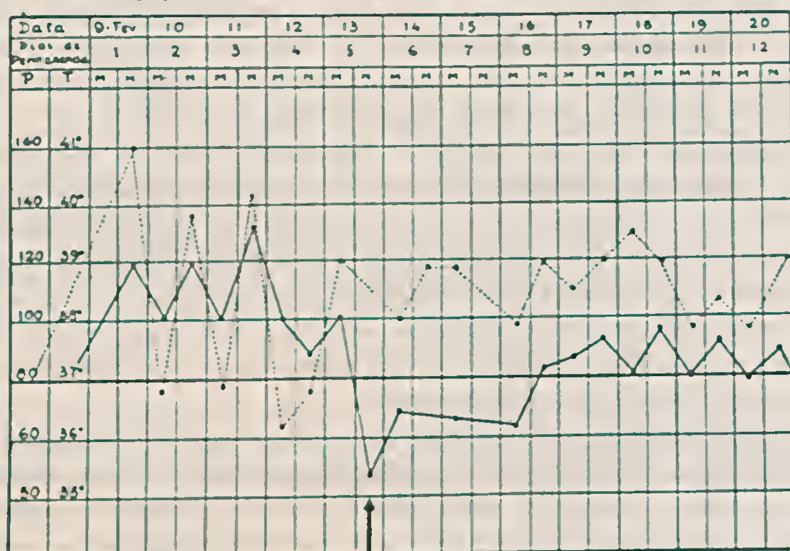
Num outro caso, uma infecção estafilocócica conseqüente a um quisto hemático supurado do ovário, a medicação sulfamidica falhou lamentavelmente. Recorreu-se logo á penicilina e o seu êxito no combate à infecção não se fez esperar. O estado da paciente era grave, atingindo a temperatura, por vêzes, a 40.3°C. Decidiu-se logo a aplicação da penicilina, iniciando-se o tratamento com uma dose de 20000 unidades Oxford, dissolvidas em sôro glicosado isotônico, em transfusão contínua na veia. A temperatura que, no início da venoclise, era de 40.3°C, após 3 horas e meia, tempo que levou a aplicação gota a gota, caiu para 36.5°C, mantendo-se a doente em apirexia até o 7° dia de tratamento. Quando



tudo demonstrava que o processo evoluia para a cura e já tencionávamos suspender a aplicação da penicilina, nova elevação térmica foi observada com reaparecimento da supuração pelos drenos.

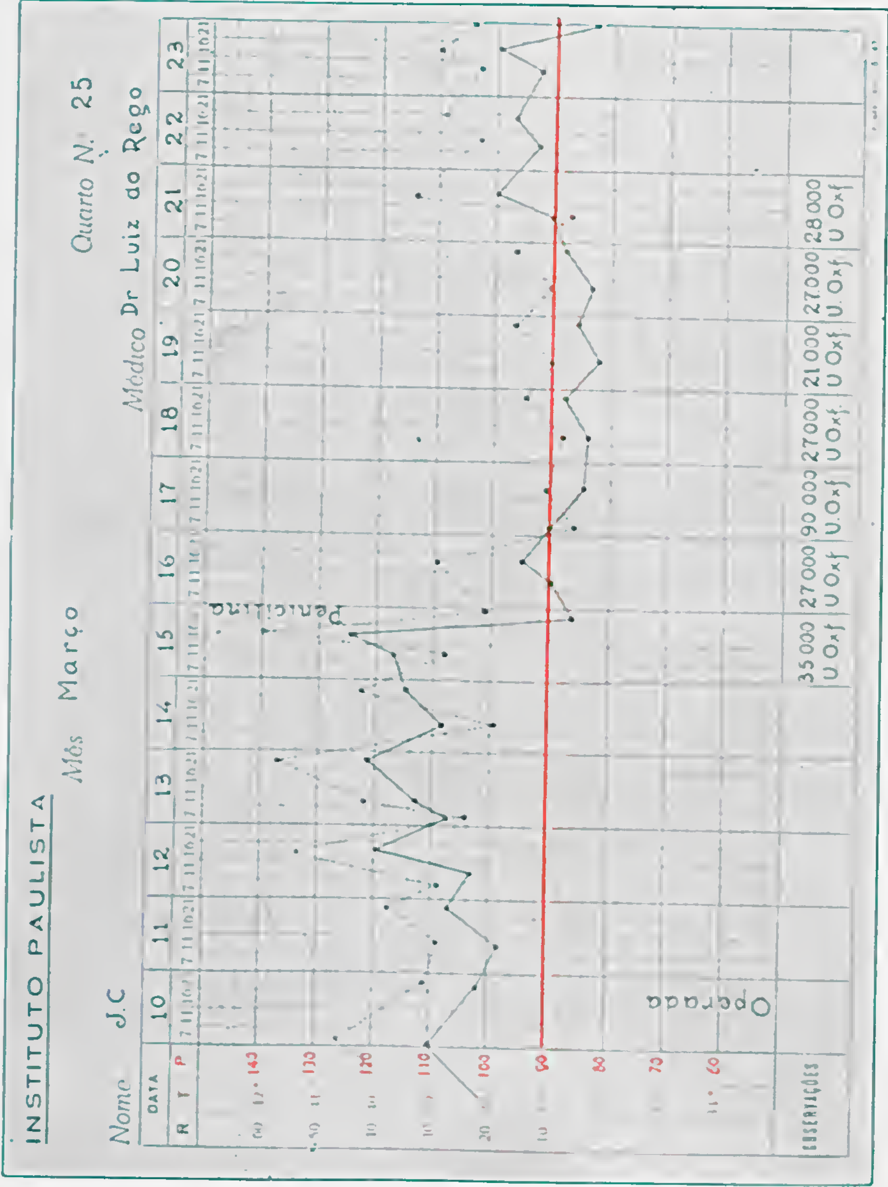
Verificando a causa dêsse aparente insucesso da penicilinoterapia, constatou-se uma infecção secundária pelo *E. coli*, para a qual a penicilina não tem ação (2, 3).

QUADRO 1





Bastaram alguns gramas de sulfamídico para que a infecção secundária fosse debelada, de vez que as condições gerais da paciente já haviam melhorado. A cultura do pús antes do tratamento revelou a presença de estafilococos e ausência de bacilos Gram-negativos, ao passo que, ao ressurgimento da supuração, encontraram-se bacilos *coli* e ausência de cocos.


INSTITUTO PAULISTA
Quarto N.° 25
Médico Dr Luiz do Rego
Mês Março
Nome J.C
DATA
R T P
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
140 130 120 110 100 90 80 70 60
Penicilina
Operada
OBSERVAÇÕES
35 000 U Oxf
27 000 U Oxf
90 000 U Oxf
27 000 U Oxf
21 000 U Oxf
27 000 U Oxf
28 000 U Oxf

Quadro 2

A ação favorável da penicilina sôbre a infecção é bem observada no Quadro II, em que se nota a queda da temperatura após a aplicação de 20000 unidades, gota a gota, na veia. Nas 10 primeiras horas a paciente recebeu 35 000 unidades de penicilina e no dia imediato 27000 unidades. Apesar da queda de temperatura verificada à primeira dose de penicilina, no dia seguinte nova elevação térmica se fez sentir, o que nos obrigou a administrar, no terceiro dia, 90000 unidades Oxford, sendo 30000 unidades em transfusão contínua na veia e 10000 unidades de 4 em 4 horas. Em 7 dias de tratamento, uma infecção grave por estafilococos foi debelada com 255000 unidades Oxford de penicilina e 6000 unidades em aplicação local pelos drenos.

Uma das séries complicações da sinusite frontal é a osteomielite, de mortalidade elevada, atingindo por vezes 80%. Todo tratamento clínico até agora tem falhado e, no dizer de Fürstenberg, a única esperança em tais casos reside na remoção radical do osso lesado.

Entre nós, Gama e Rezende Barbosa (4) descrevem um caso de osteomielite do frontal, em que a intervenção de Fürstenberg foi praticada com sucesso, porém nem sempre isto acontece.

Com a introdução da penicilina, têm-se conseguido melhores resultados na cura da osteomielite dos ossos da face. Williams e Nichols (5) apresentam dois casos, complicados com septicemia, curados pelas penicilinoterapia. Kirby e Hepp (6) relatam 5 casos de osteomielite dos ossos da face, tratados com bons resultados. A dose de penicilina aplicada nesses casos é motivo de controvérsias. Kirby e Hepp, em dois pacientes tratados com pequenas doses durante poucos dias, observaram recidivas, as quais só puderam ser evitadas por um tratamento prolongado e com doses macissas como foi verificado em 3 casos, que chegaram a receber um total de 7540000 u. Oxford.

Num ponto quase todos estão de acôrdo: em infecções graves é mister administrar a penicilina em transfusões contínuas na veia, seguidas de doses fracionadas em intervalos regulares. Ótimos resultados foram conseguidos, aplicando 200000 u. O. gôta a gôta na veia e 15000 u. O. de 3 em 3 horas.

O caso grave de osteomielite do frontal por nós referido, onde sòmente restava o recurso da intervenção mutilante de Fürstenberg, cedeu com doses relativamente pequenas de penicilina. Tomámos o cuidado de prolongar o tratamento durante 30 dias, reduzindo pouco a pouco a dose de penicilina em 24 horas. Diariamente a penicilina foi aplicada, parte em transfusão contínua na veia e parte em doses fracionadas de 4 em 4 horas, por via intramuscular e endovenosa. No primeiro dia o paciente recebeu 40000 u. O. em transfusão contínua e 10000 unidades por via venosa de 4 em 4 horas, com uma dosce de 90000 u. O. em 24 horas. Nesse mesmo dia foram aplicadas 5000 u. O. da solução do sal de bário localmente na incisão operatória. Nos três dias subseqüentes a dose

foi reduzida para 12000 u. 0. em transfusão contínua e 4000 u. 0 de 4 em 4 horas. O total de unidades administrativas por via parenteral e local foi de 607 000 u. 0. em 30 dias de tratamento, sendo que, decorridos 9 meses, sob constante vigilância clínica, o paciente está aparentemente curado.

Acreditamos que na penicilinoterapia o mais importante é o tempo de duração do tratamento e não tanto a quantidade de medicamento administrado em 24 horas. As recidivas conseqüentes a doses baixas talvez possam ser atribuidas ao curto tempo de tratamento.

O caso relatado de infecção do artelho era de mau prognóstico, pois havia início de gangrena e o estado do paciente era grave. Logo ás primeiras aplicações locais de penicilina em compressas, as dôres cessaram e o estado geral do paciente melhorou. Decorridas 12 horas da aplicação local, iniciou-se a penicilinoterapia por via parenteral. Em 4 dias de tratamento com um total de 70000 u. 0. em injeção, a infecção foi debelada.

Deixamos consignados nossos agradecimentos aos Drs. A. Luiz do Rego e Eugênio F. Marcondes F°, do Instituto Paulista, aos Drs. Milton Olinto de Arruda, Américo Armando Bruno, Renato Barbosa, A. Perella, do Hospital Municipal, pelo auxílio inestimável, que prestaram na realização do presente trabalho.

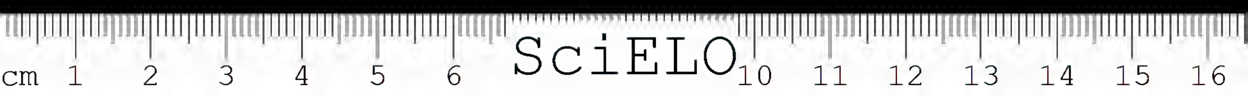
RESUMO

Apresentam os autores as observações clínicas de seis casos tratados e curados com a penicilina obtida e purificada no Instituto Butantan, sob a forma de sal de bário. Como a produção do sal fosse em pequena escala, a penicilina foi aplicada em casos selecionados, nos quais já haviam falhado outros tratamentos específicos. As doses empregadas variaram entre 20000 e 588 00 u. Oxford.

O insucesso aparente, verificado na cura de uma infecção estafilocócica, conseqüente a um quisto hemático supurado do ovário, é atribuido á associação secundária da *E. coli*, contra a qual a penicilina é inoperante.

Em aplicação local foi usado, quer o sal de bário em solução isotônica, dosando de 100 a 1000 u. Oxford por centímetro cúbico, quer o filtrado do cultivo de *P. notatum*, dosando de 20 a 30 u. 0. por cm^3. O filtrado mostrou ser um potente antisséptico e excelente adjuvante do tratamento geral, por meio de injeções continuas na veia, seguidas de injeções venosas ou intramusculares, com intervalos de 4 horas, afim de manter uma concentração sanguínea adequada.

Poucas ou nulas foram as reações produzidas pelo sal de bário. Nas aplicações endovenosas, os pacientes queixavam-se de gôsto metálico e, por vêzes, náuseas. Nas aplicações pelas vias muscular e subcutânea, observaram-se reações dolorosas. Um caso de urticária foi verificado.



ABSTRACT

1. The clinical results of six cases, treated with penicillin (Purified barium salt — Instituto Butantan) are described.
2. Due to the small amount of penicillin available, only those cases have been selected in which previous specific treatment failed.
3. The total dosage varied between 20 000 and 588 000 Oxford units (0. U.).
4. The apparent failure of penicillin to cure a *Staphylococcus* infection of hematic suppurated of the ovary, was due to a secondary *E. coli* infection of known penicillin ineffectiveness.
5. Filtrates of *Penicillium notatum* cultures, 20 O.U., per ml, and solutions of isotonic barium salt solution, 100 O. U. per ml, have also been used locally. The filtrate has proved a potent antiseptic and an excellent adjuvant in general treatment by intravenous dry infusion followed by intramuscular injections every four hours.
6. Few, if any, reactions were noticed with the barium salt, when applied intravenously. The patients complained of a metallic taste and sometimes nausea. Painful local reactions have been observed when the intramuscular and subcutaneous routes were used. One case of urticaria was observed.

BIBLIOGRAFIA

1. *Keefer, C. S.; Blake, F. G.; Marshall, E. K., Jr.; Lockwood, J. S. & Wood, W. B., Jr.* (1943). Penicillin in the treatment of infections: a report of 500 cases. *J. Amer. Med. Assn.*, 122, 1217-1224.
2. *Booth, V. H. & Green, D. E.* (1938). A wet-crushing mill for microorganisms. *Biochem. J.*, 32, 855-861.
3. *Christie, R. V. & Garrod, L. P.* (1944). A penicillin therapeutic research unit. *Brit. med. J.*, 1, 513-154.
4. *Gama, C. & Barbosa, J. E. Rezende.* (1942). Osteomielite frontal. Operação de Fürstenberg. *Rev. brasil. de oto-rino-laring.*, 10, 573-584.
5. *Williams, H. L. & Nicohls, D. R.* (1943). Spreading osteomielitis of the frontal bone treated with penicillin. *Proc. Staff Meet., Mayo Clin.*, 18, 467-469.
6. *Kirby, W. M. M. & Hepp, V. E.* (1944). Treatment of osteomielitis of the facial bones with penicillin. *J. Amer. med. Assn.*, 125, 1019-1022.

OBSERVAÇÕES SÔBRE DEZ CASOS DE ELIPTOCITOSE (OVALOCITOSE)

POR

GASTÃO ROSENFELD

(Do Laboratório de Anatomia Patológica, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A eliptocitose é uma anomalia congênita do "Eritron" bem individualizada, porém rara. Na América do Sul há somente a verificação de SILVESTRE & ITHURRAT (1931), na Argentina (1), e a de CRUZ & MELLO (1940), no Brasil (2); êstes últimos mencionam apenas um caso no seu trabalho sôbre a verificação do grau de eliptocitose em indivíduos normais.

Tivemos ocasião de observar 10 casos em 4 gerações de uma família brasileira e estudamos alguns fatos ocorrentes nessa anomalia.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos observados:

O primeira caso encontrado foi um achado casual no decurso de um exame hematológico para verificação de anemia. Os outros eram parentes desse doente, solicitados para verificação da eliptocitose, tendo sido praticados os exames adiante relacionados somente nos que apresentavam a anomalia.

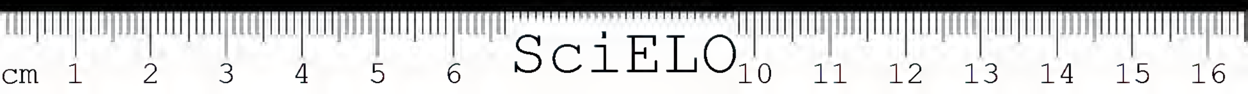
Caso 1 — B. S. U. — brasileira, branca e com toda a ascendência da mesma naturalidade. 70 anos de idade, tendo tido 14 filhos: 1 falecido na presente guerra com 30 anos, sadio e 4 falecidos na primeira infância, sem icterícia ou anemia. Nada sente, há alguns anos tem hipertensão moderada. Todos os casos apresentados a seguir são seus descendentes.

Caso 2 — A. U. K. — filha do caso 1, 51 anos, com 4 filhos, todos vivos, sem abortos; nunca teve icterícia, nem anemia. Queixa-se de digestão difícil, prisão de ventre há vários anos e rebelde a todos os tratamentos; exames parasitológicos de fezes negativos.

Caso 3 — O. U. K. — filho do caso 2, 31 anos, com 2 filhos sadios; sua esposa não teve abortos. Nunca apresentou icterícia, nem anemia. Sente astenia, tem hipotensão, porém está cansado por excesso de trabalho.

Caso 4 — C. U. K. J. — filho do caso 2, 29 anos, com 1 filho vivo e outro que faleceu ao nascer, em conseqüência de trabalho de parto com forceps, e que era de peso e aspeto normais. Tem amebíase crônica (*Endamoeba histolytica*), ora em tratamento; sente astenia, tem hipotensão.

Caso 5 — C. K. Neto — filho do caso 4, 15 meses de idade, nascido a têrmo, forte e de aspeto sadio.



Caso 6 — N. U. K. — filha do caso 2, com 21 anos, solteira. Nunca teve icterícia, nem anemia. Aos 3 anos teve paralisia infantil. Nada sente.

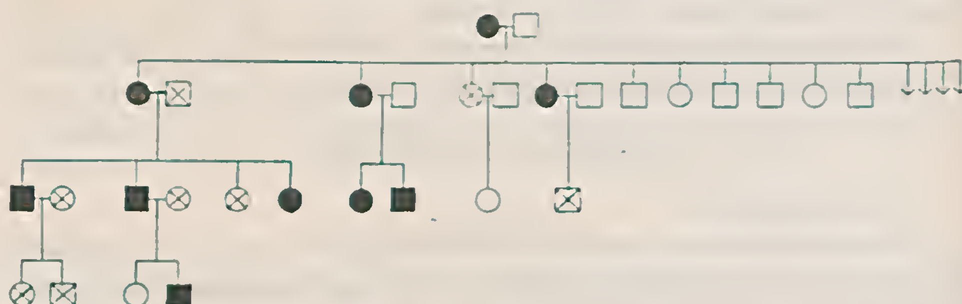
Caso 7 — B. U. L. — filha do caso 1, 40 anos, com 2 filhos, nunca teve abortos, nem icterícia ou anemia. Há um ano teve uma mielite ascendente, da qual está quasi completamente curada, sentindo apenas uma fraqueza nas pernas. Este caso apresenta uma anemia sem hemólise, que julgamos ser conseqüência secundária da sua moléstia, não tendo sido feito tratamento nesse sentido.

Caso 8 — L. U. L. — filha do caso 7, com 7 anos de idade. Nunca teve anemia, nem icterícia. É de aspeto sadio e nada sente.

Caso 9 — H. A. U. L. — filho do caso 7, 3 anos de idade. 15 dias depois de nascer teve espasmo do piloro. Nunca teve anemia, nem icterícia. É de aspeto sadio.

Caso 1o — H. U. O. — filha do caso 1, 30 anos; tem 1 filho sadio, nunca teve abortos, nem anemia ou icterícia. Tem maus dentes e piorréia; quanto ao mais, nada sente.

Quadro 1



Representa a família por nós estudada. Quadrados: sexo masculino; círculos: sexo feminino; em preto: com eliptocitose; com cruzeta: sem eliptocitose; em branco: não examinados.

MÉTODOS

O volume globular foi determinado pelo método de Wintrobe; o diâmetro médio, difractometricamente com o eritrocitómetro de Haden-Hausser; para os outros dados observados foram utilizados os métodos usuais.

Foram considerados como valores eritrocitários normais, os de Haden, porém para a hemoglobina foi admitido 15 g = 100%. A concentração média da hemoglobina por hemácia foi deduzida desses dados.

Quanto à forma, foi adotado o critério de divisão dos eritrocitos em três categorias: redondos, os circulares ou um pouco ovalados, porém dentro dos limites usuais de variação; elípticos, os que apresentavam essa forma bem evidente; fortemente elípticos, os que eram muito alongados, com uma largura máxima de aproximadamente 2 a 3 micra.

Para observar as hemácias, evitando tanto quanto possível a alteração de suas formas primitivas, foi empregada a seguinte técnica: 2 gotas de sangue venoso oxalatado eram misturadas a 0.5 ml de solução fisiológica com 10% de formalina. O sangue periférico era gotejado diretamente em idênticas proporções na mesma solução adicionada de 0.5% de oxalato de potássio. Após 5 minutos de espera, afim de permitir a fixação, eram feitas as preparações entre lâmina e lamínula e esfregaços corados com eosina a 1% ou métodos pancromáticos.

Para a verificação da resistência das diferentes formas de hemácias em soluções hipotônicas, foi utilizado o seguinte método: os tubos com sangue, utilizados para verificação da resistência globular, após a leitura foram adicionados com 10% de formalina e agitados. Depois de um repouso de 5 minutos, afim de fixar as hemácias, foram centrifugados ligeiramente. Os esfregaços feitos com o sedimento, depois de sêcos, foram fixados pelo metanol e corados com eosina a 1%. Em cada lâmina foram contados 100 eritrocitos não hemolisados, classificados em 3 tipos: redondos, nitidamente e fortemente elípticos. Procedemos desse modo nos tubos da zona intermediária, isto é, desde o primeiro ao último tubo, em que houve hemólise parcial. Com essa técnica evitamos qualquer alteração da forma das hemácias durante a distensão sôbre as lâminas e a eventual destruição das que estivessem no limiar da hemólise.

Para verificar si a microcitose era um caráter intrínseco do eliptocito ou devida à falta de concentração de hemoglobina, fizemos no caso 4 um tratamento de 50 dias pelo cloreto ferroso (4 drágeas ao dia, equivalendo a 700 mg de ferro). Êsse paciente não tinha anemia, o volume médio das hemácias era baixo, o que poderia ser devido à falta de saturação pela hemoglobina existente no caso.

RESULTADOS

Os dados hematológicos da Tabela 1 mostram que havia uma ligeira tendência à baixa do número de hemácias e da hemoglobina, sem anemia, que existia só no caso 7. Êste tinha, porém, outra causa possível para a anemia, sendo mais provável não ser esta, conseqüência da eliptocitose. Com exceção de um caso, os outros tinham diminuição do diâmetro médio das hemácias. A percentagem de reticulocitos e a resistência globular não mostraram alterações. O índice ictérico normal em 4 casos, estava ligeiramente aumentado nos outros, havendo causa estranha possível para isso somente na observação 4. Com exceção de um, todos apresentaram um aumento ligeiro do baço, que chegava a ser palpável em dois deles. Encontramos em todos percentagens elevadas de eliptocitos e êsses números eram constantes nas verificações feitas com diversos intervalos em três casos.

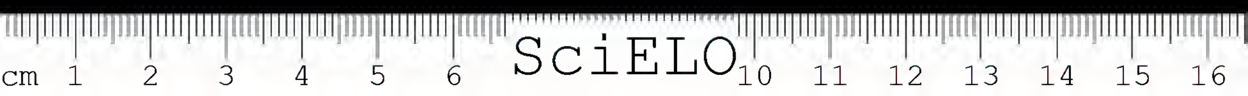


TABELA I

Caso	Hemacias mm3	Hemoglobina %	Valor Globular	Diametro medio µ	Volume globular %	Volume medio µ3	Indice ict-rico unidades	Espessura media µ	Reticulocitos %	Baço	Ressistencia globular NaCl %	Tipo sanguineo	Hemosedimentação mm3	Hemacias %		
														Elipticas	Fortemente elipticas	Total de eliptocitos
1	4.520	86	0,95	7,6	38,29	84,5	7	7	1,6	+	3,6-4,4	A	7	94,3	2,5	96,8
2	4.040	78	0,96	7,5	35,19	87	9	1,97	1,8	++	3,6-4,4	O	12	87,8	6,2	94,0
3	4.740	86	0,90	7,5	37,26	77,8	6	1,75	1,9	+	3,4-4,0	O	14	87,8	5,7	93,5
4	5.480	96	0,88	7,3	41,40	75	14	1,8	0,9	++	3,2-4,1	O	4	87,2	8,3	95,5
5	4.720	80	0,84	7,5	35,19	74,5	—	1,65	—	0	3,2-4,4	O	11	87,3	2,0	89,3
6	4.560	88	0,96	7,6	37,23	83	10	1,85	1,6	+	3,4-4,4	O	7	90,8	5,4	96,2
7	3.840	76	0,98	7,7	33,12	86,2	6	1,85	1,7	+	3,6-4,4	O	24	90,7	4,6	95,3
8	4.680	81	0,89	7,5	36.22	77,5	5	1,75	0,7	+	3,2-4,2	O	13	87,7	0,7	04,4
9	4.220	82	0,97	7,4	35,19	83,5	5	1,95	1,0	+	3,2-4,2	B	11	85,6	6,8	92,4
10	4.620	88	0,95	7,6	39,33	85	12	1,9	2,1	+	3,6-4,4	A	5	89,6	4,1	93,7
Media	4.520	84,4	0,928	7,52	36,84	81,4	8,2	1,83	1,47		3,2-4,32			88,8	5,23	94,11
Normal	5.000	100,0	1,0	7,7	45,00	90,0	4-6	1,95	0,5-1,0		3,2-4,2		5 8			

Baço: + = Percutível; ++ = Palpável no rebordo: o = Não percutível.
Hemoglobina: 100% = 15 gr. %.

Variação do número de eliptocitos — Observamos que no mesmo esfregaço nas partes em que é delgado, são encontradas quasi tão somente formas redondas (Fig. 1), enquanto nas partes mais espessas o número de eliptocitos é muito

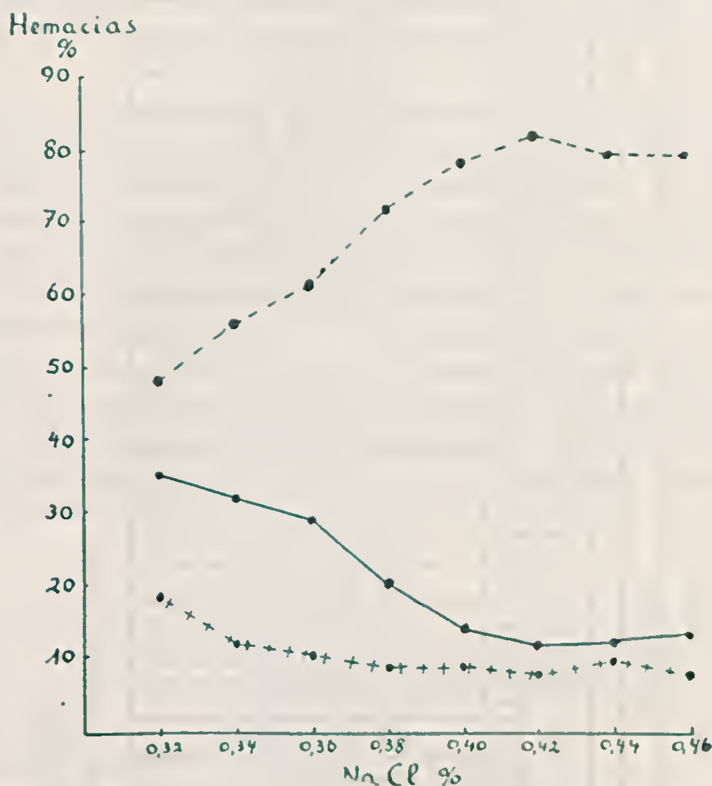


GRÁFICO 1

Percentagens de hemacias redondas, fortemente elipticas e elipticas, que resistiram à hemólise nas soluções cloretadas em que houve hemólise parcial. Médias obtidas nos 10 casos (Tabela 1).

++ hemacias redondas; —— hemacias fortemente elipticas; — — hemacias elipticas.

elevado (Fig. 2). Nas preparações a fresco, o número de eliptocitos era maior e mais uniforme. Nas lâminas a fresco ou em esfregaços feitos com sangue formolado ,a eliptocitose era mais evidente, regular e de constatação mais segura do que nas preparações usuais (Fig. 9).

Forma em naveta — Numerosos eliptocitos apresentavam-se com um aspeto de naveta. Essa forma é devida à depressão central ser redonda ou, quando é oval ,não acompanha totalmente a forma da hemácia, acarretando uma zona periférica mais espessa nas extremidades (Figs. 9, 5 e 6).

Tabela 2

Sol. NaCl %	CASOS 1 Hemacias %			1 Hemolise	2 Hemacias %			2 Hemolise	3 Hemacias %			3 Hemolise	4 Hemacias %			4 Hemolise	5 Hemacias %			5 Hemolise	6 Hemacias %			6 Hemolise	7 Hemacias %			7 Hemolise	8 Hemacias %			8 Hemolise	9 Hemacias %			9 Hemolise	10 Hemacias %			10 Hemolise	Medias %		
	O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1		O	0	1
0,30	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
0,32	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	19	42	39	±	16	54	30	±	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	17,5	48	34,5
0,34	14	55	31	±	10	48	42	±	8	50	42	±	15	48	37	±	15	60	25	±	13	55	32	±	—	—	—	+	10	64	26	±	9	75	16	±	12	49	30	±	11,8	56	32
0,36	9	61	30	±	8	54	38	±	10	59	31	±	16	49	35	±	18	64	18	±	8	66	26	±	6	54	40	±	10	71	19	±	7	81	12	±	10	54	36	±	10,2	61,3	28,5
0,38	7	72	21	±	12	69	19	±	9	62	29	±	15	52	33	±	8	81	11	±	7	77	16	±	8	73	19	±	5	75	20	±	6	84	10	±	—	—	—	.	8,55	71,6	19,6
0,40	8	84	9	±	16	82	2	±	16	64	24	±	9	61	30	±	6	87	7	±	—	—	—	.	10	78	12	±	5	82	13	±	7	86	7	±	4	79	17	±	8,55	78	13,4
0,42	5	84	11	±	8	88	4	±	—	—	—	o	9	67	24	±	7	83	10	±	8	86	6	±	6	83	11	±	6	79	15	±	9	83	9	±	8	80	12	±	7,2	81,4	11,3
0,44	12	80	8	±	10	81	9	±	—	—	—	o	10	69	21	±	5	88	7	±	9	81	10	±	6	79	15	±	—	—	—	o	—	—	—	o	14	75	11	±	9,4	79	11,5
0,46	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	7	79	14	±	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	7	79	14
0,48	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—	o	—	—	—

O = Hemacias redondas; 0 = Hemacias elípticas; 1 = Hemacias fortemente elípticas.
+ = Hemolise total; ± = Hemolise parcial; o = Ausência de hemolise.

Esferocitos — Foram encontrados em todos os casos nas preparações formoladas, alguns esferocitos típicos (Figs. 7 e 8). Em esfregaços feitos sem fixação prévia, também foi notado um ligeiro grau de esferocitose, que aparecia nas partes mais delgadas do esfregaço, o que é um artifício de técnica, pois nessas condições as hemácias tendem â forma redonda e perdem a depressão central (Figs. 1 e 3).

Resistência dos eliptocitos — Os resultados da Tabela 2, representados no Gráfico 1, demonstram claramente que os eliptocitos resistem mais do que as hemácias redondas â hemólise nas soluções salinas hipotônicas. Os eritrocitos fortemente elípticos, quando se hemolisavam, conservavam a sua forma, ao passo que dos elípticos uma parte tomava a forma esférica, pela hipotonicidade do líquido, o que explica a percentagem das formas redondas ser maior nas soluções menos concentradas e diminuir gradativamente com a maior proporção de ClNa.

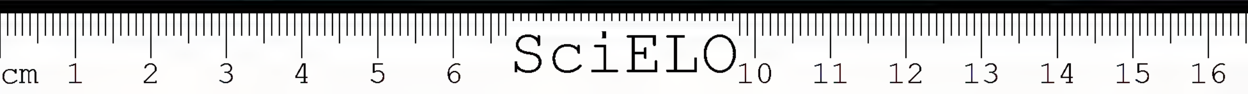
Microcitose — Em todos os casos foi constatada uma microcitose de grau variado. Na experiência feita com o caso 4, o volume médio das hemácias não se modificou, conservando-se baixo, apesar do tratamento ter aumentado a concentração de hemoglobina, tendo mesmo o índice de saturação chegado muito próximo do máximo (Tabela 3).

TABELA 3

Caso 4	Antes do tratamento	Após tratamento pelo Fe	
		30 dias	50 dias
Hemácias por mm_3.....	5.480.000	5.500.000	5.420.000
Hemoglobina grs. %....	14,4	15,6	16,0
Concentração da Hb corpuscular media em γγ	26,3	28,3	29,4
Indice de saturação ...	0,875	0,945	0,980
Volume médio da hemacia cm μ_3	75	72	75

DISCUSSÃO

Variação do número de eliptocitos — GÜNTHER (1928) (3) e TERRY e colaboradores (1932) (4) notaram nos esfregaços um número menor de eliptocitos em relação às preparações a fresco. STEPHENS e TATELBAUM (1935) (5), WYANDT e colaboradores (1941) (5), notaram que há variações no número de eliptocitos em preparações iguais, colhidas no mesmo momento de um mesmo indivíduo. Essas diferenças foram atribuidas a causas externas secundárias não



determinadas. Observamos que a causa dessa irregularidade é a própria distensão do sangue na lâmina, que deforma os eliptocitos parcialmente e de modo variável para a forma redonda nas partes finas dos esfregaços. Com a técnica de fixação prévia das hemácias, podem-se evitar alterações devidas a causas externas, conservando os glóbulos suas formas tais quais eram no sangue circulante. Permite, além disso, evidenciar rapidamente e com segurança os casos de eliptocitose, que poderiam passar desapercebidos em esfregaços usuais.

Forma em naveta — Êsse método de exame evita também confusão com os casos de pseudo-eliptocitose, em que não aparece a forma em naveta. Não encontramos êsse tipo de hemácia elíptica em casos de anemias, moléstias diversas ou indivíduos normais, que, no entanto, apresentavam alguns eliptocitos nos esfregaços comuns. Essa forma parece ser caraterística da eliptocitose.

Esferocitos — Wyandt e colaboradores (1941) (5) apresentaram a fotomicrografia de um caso, em que é evidente a presença de esferocitos. Há vários outros casos semelhantes na literatura e em todos havia anemia hemolítica com diminuição da resistência globular. Até agora não houve explicação para êsse fato e em geral atribuiu-se-o a uma concomitância da presença da esferocitose (icterícia hemolítica familiar), o que julgamos pouco provável. Leitner (1939) (6), nos seus casos em que não havia anemia, notou a presença de hemácias menores do que as normais. Verificamos o mesmo fato em todos os casos e a fotomicrografia 6 demonstra que essas hemácias menores são esferocíticas, o que modifica o conceito geral de que a presença de esferocitos existe somente nalguns casos, em que há coincidência com a esferocitose moléstia. O eventual aumento do número desses esferocitos, acrescido da alteração devida ao esfregaço usual, que faz com que tendam a essa forma mais hemácias, pode ter levado êsses autores à afirmação da concomitância das duas moléstias. Os esferocitos que encontramos, não podem ser imputados a artifícios do esfregaço, pois o sangue havia sido previamente fixado.

Resistência dos eliptocitos — Terry e colaboradores (1932) (4) afirmaram, baseados em observação sumária, que os eliptocitos são mais resistentes do que as hemácias redondas nas soluções hipotônicas. Confirmamos êsse fato, que é contrário à hipótese de Leitner (1939) (5), para a explicação das anemias hemolíticas observadas por outros autores na eliptocitose; atribuiu a hemólise a uma maior facilidade de destruição dos eliptocitos, em conseqüência da sua maior fragilidade, por serem células mais velhas. Contra êsse ponto de vista, além dos dados acima, há ainda a contestar que, si é fato comprovado que os eliptocitos assumem sua forma depois da fase de reticulocitos, não há provas de que isto se dê em período tardio da fase madura de eritrocito, não se podendo, portanto, assegurar que sejam mais velhas do que as outras hemácias maduras.

Microcitose — Diversos autores (STEPHENS & TATELBAUM, 1935, LIEBERHERR, 1938, SÖDERSTRÖM, 1938, LEITNER, 1939, e WYANDT e colaboradores, 1941) (5) constataram uma diminuição do volume da hemácia num número bem elevado de casos, porém atribuiram essa alteração a uma mera coincidência. Observamos o mesmo nos nossos pacientes e na experiência relatada, mesmo elevando o índice de saturação da hemácia até muito próximo do normal, não se obteve aumento do volume, que permaneceu sempre baixo. A verificação de microcitose em número relativamente tão elevado de casos, ao lado dessa observação, leva a supor que a diminuição do volume da hemácia faz parte do quadro da anomalia e é inerente à forma do eliptocito.

RESUMO

O autor apresenta 10 casos de eliptocitose em 4 gerações de uma família brasileira. Observou número muito elevado de eliptocitos, microcitose, diâmetro médio diminuido, resistência globular e reticulocitos normais, índice ictérico ligeiramente aumentado em 6 casos, baço um pouco aumentado em 9 e ausência de anemia.

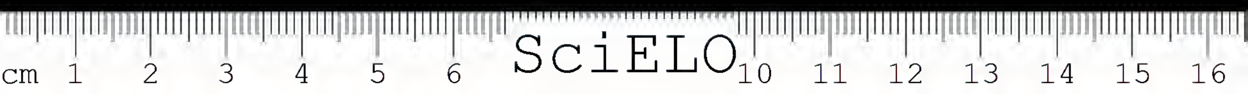
Nos esfregaços há variação do número de eliptocitos, que tendem à forma redonda nas partes finas das lâminas. Para evitar alterações secundárias das formas das hemácias, tanto a fresco como em esfregaços, juntam-se 2 gotas de sangue periférico a 0.5 ml de solução fisiológica com 0.5% de oxalato de potássio e 10% de formalina; si for usado sangue venoso pode ser dispensado o oxalato. Com essa técnica, quando existe eliptocitose, a percentagem de hemácias elípticas é elevada (cerca de 90%).

Os eliptocitos apresentam muitas vezes uma forma de naveta, por haver uma zona periférica mais espessa nas duas extremidades. Essa forma não foi encontrada nos casos normais ou com outros moléstias que apresentavam eliptocitos em esfregaços.

Há sempre alguns esferocitos. Os eliptocitos são mais resistentes do que as hemácias redondas em soluções hipotônicas e a microcitose existe mesmo quando não há anemia e as hemácias estão saturadas de hemoglobina.

ABSTRACT

The author presents 10 cases of elliptocytosis in 4 generations of a Brazilian family. A very high number of elliptocytes were observed, as well as microcytosis, reduced median diameter, somewhat increased icteric index in 6 cases, slightly enlarged spleen in 9 cases; absence of anemia, globular resistance and reticulocytes normal.



In smears the elliptocytes vary in number and tend to round shape at the thinner portions of the slide. In order to prevent secondary alterations of the shape of the red cells, whether fresh or in smears, 2 drops of peripheric blood are added to 0.5 ml. of saline solution with 0.5% potassium oxalate and 10% formaline; when venous blood is used, no oxalate is needed. With this technic it is possible to obtain a high percentage of elliptical red cells (about 90%) in elliptocytosis.

The elliptocytes are very often spindle-shaped, due to the thicker peripheric zone at both extremities. This form was not recorded in normal cases or cases of other diseases which showed elliptocytes in smears.

There are always some espherocytes. The elliptocytes are more resistant than the round red cells in hypotonic solutions and microcytosis occurs even when there is no anemia and the red cells are saturated with hemoglobin.

BIBLIOGRAFIA

1. *Varela, M. E.* (1941). *Hematologia clinica*, 478 pp., ilus. Buenos Aires, El Ateneo, p. 148.

2. *Cruz, W. O. & Mello, R. P.* (1940). Contribuição ao estudo da eliptocitose. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **35**, 125-135.

3. *Günther, H.* (1928). Formprobleme an menschlichen Erythrozyten. *Folia haemat., Lpz.*, **37**, 383-417.

4. *Terry, M. C., Hollingsworth, E. W. & Eugenio, V.* (1932). Elliptical human erythrocytes; report of 2 cases. *Arch. Path.*, **13**, 193-206.

5. *Wyandt, H., Bancroft, P. M. & Winship, T. O.* (1941). Elliptic erythrocytes in man. *Arch. Int. Med.*, **68**, 1043-1065.

6. *Wintrobe, M. M.* (1942). *Clinical hematology*, 792 pp., 174 ilus. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 65-67.

(Recebido para publicação em abril de 1945).

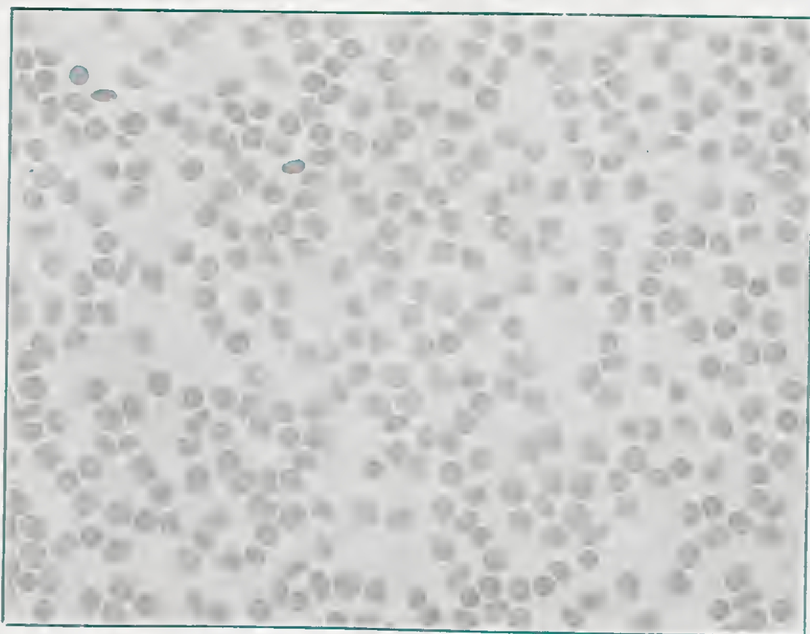


FIG. 1 (Fotomicro)
Aspeto em zona fina do esfregaço. Mesma lâmina que a fig. 2.

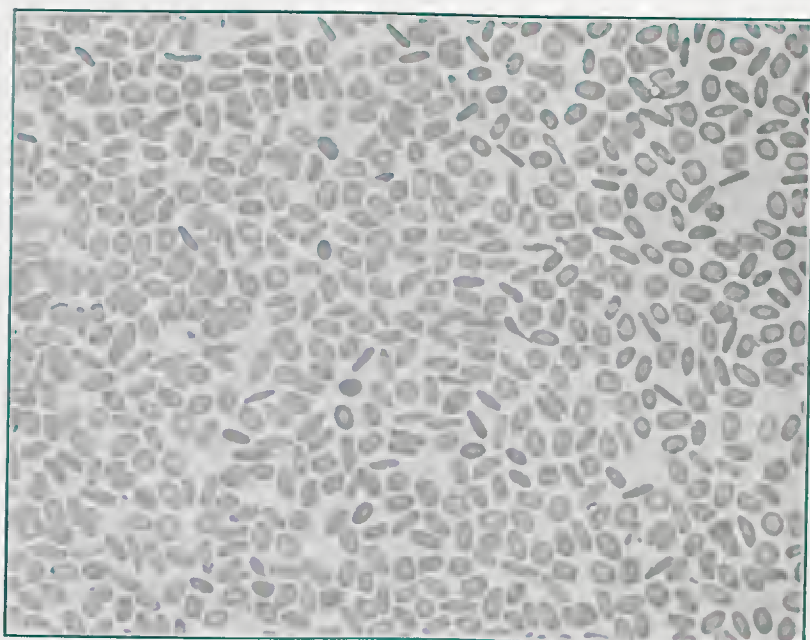


FIG. 2 (Fotomicro)
Aspeto em zona mais espessa do esfregaço. Mesma lâmina que a fig. 1.

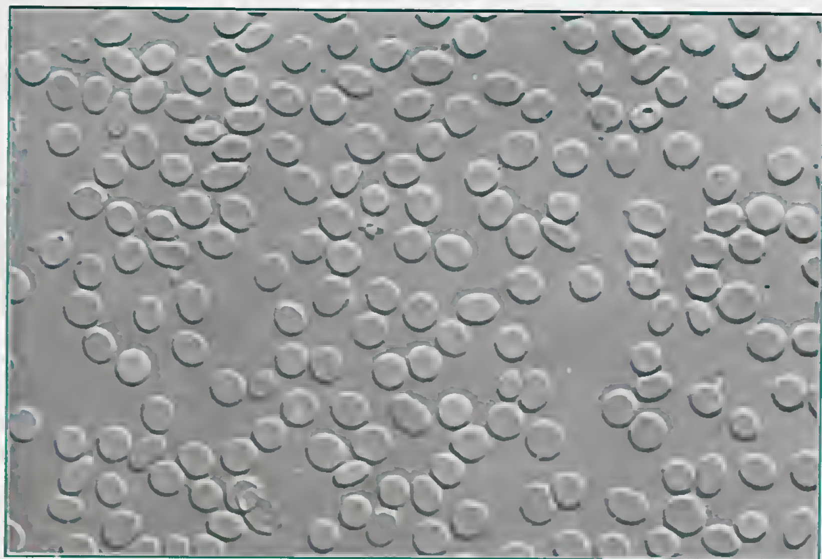


Fig. 3 (Fotomicro)
Mesmo que a fig. 1 com efeito estereoscópico.

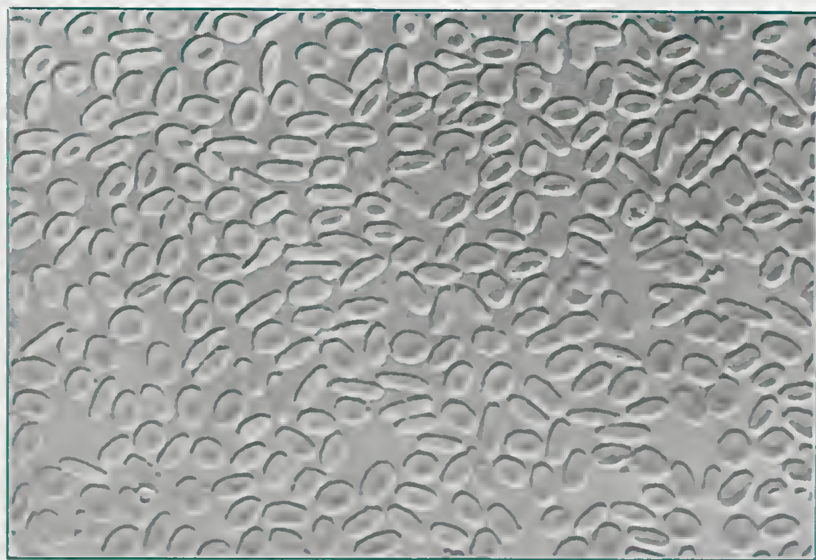


Fig. 4 (Fotomicro)
Mesmo que a fig. 2 com efeito estereoscópico.

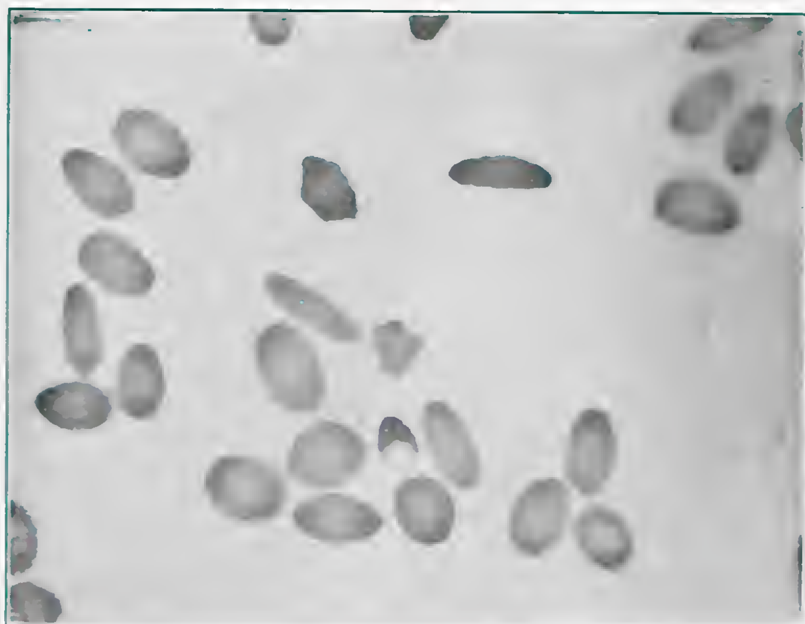


FIG. 5 (Fotomicro)
Preparação pela nossa tecnica, esfregaço fixado e corado com eosina. Aspecto em naveta.



FIG. 6 (Fotomicro)
Mesmo que a fig. 5 com efeito estereoscópico.



FIG. 7 (Fotomicro)
Mesma lâmina que a fig. 5. Notam-se 2 esferócitos.

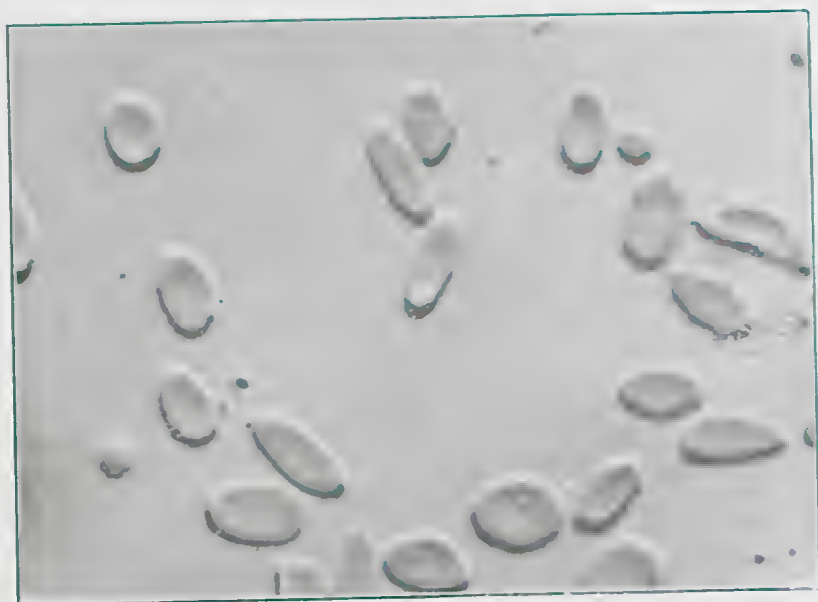


FIG. 8 (Fotomicro)
Mesmo que a fig. 7 com efeito estereoscópico.

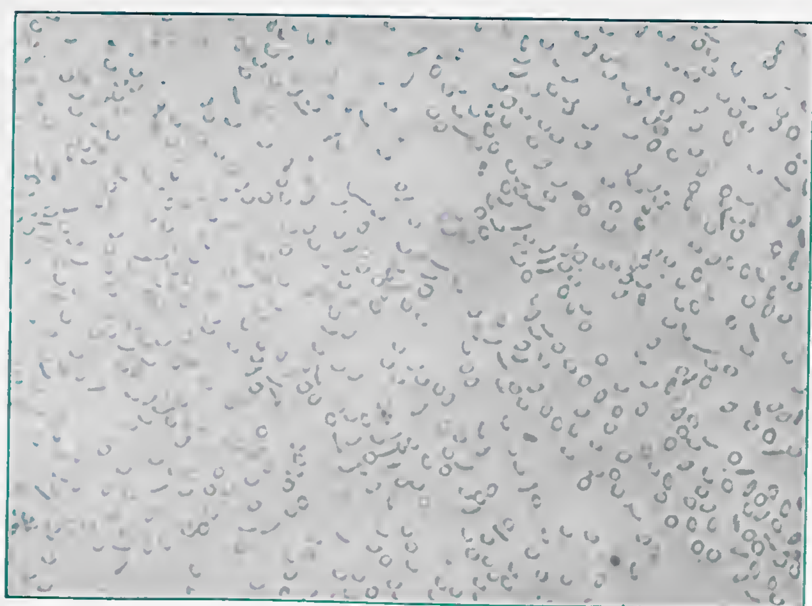
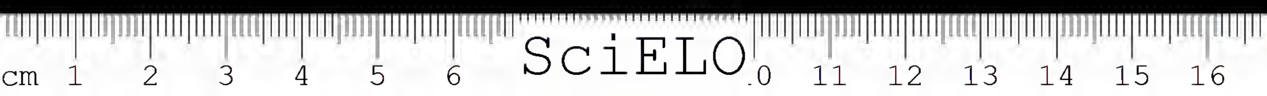


Fig. 9 (Fotomicro)
Preparação a fresco segundo a técnica que aconselhamos. Eliptocitose sem variações em tôda a lâmina e aspeto em "naveta".


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

CRIAÇÃO ARTIFICIAL DE *AMBLYOMMA CAJENNENSE* PARA O PREPARO DA VACINA CONTRA A FEBRE MACULOSA

POR

J. TRAVASSOS & A. VALLEJO-FREIRE

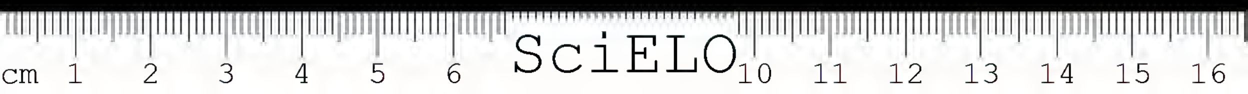
(Do Laboratório de Virus e Riquétsias do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

CONTEÚDO

A — INTRODUÇÃO

Dilatam-se cada vez mais os limites geográficos da incidência da febre maculosa na América do Sul.

Reconhecida pela primeira vez no Estado de São Paulo, Brasil, em 1929 (1,2) e aparentemente circunscrita a áreas suburbanas da Capital, a febre maculosa foi nestes últimos anos continuamente identificada em outras regiões, não só do nosso País, como do continente sulamericano.



No Brasil, só no Estado de São Paulo, onde ela é melhor conhecida, várias centenas de casos fatais da doença foram observados em cêrca de 30 áreas diferentes e distanciadas umas das outras. Em muitas dessas áreas, novos casos são constatados anualmente e, em algumas delas, já foram encontrados vetores naturalmente infetados, o que permite considerá-las verdadeiros focos de infecção.

No Estado de Minas Gerais, a febre maculosa foi diagnosticada nas mais variadas localidades e, ultimamente, no Estado do Rio de Janeiro, alguns casos foram reconhecidos em quatro zonas diferentes.

À medida que se difundem os conhecimentos relativos ao diagnóstico desta riquetsiose, o número de casos aumenta nas estatísticas demógrafo-sanitárias. A larga disseminação dos vetores (carrapatos do gênero *Amblyomma*) responsáveis pela propagação da infecção, faz com que grandes extensões territoriais sejam consideradas focos potenciais da doença.

Acentua-se, desta sorte, e cada vez mais, a importância desta grave infecção, que atinge principalmente o trabalhador rural. Certamente, com o tempo poderá assumir proporções de grande significação nacional e quiçá continental, não só quanto ao número de casos como quanto à extensão das áreas atingidas, dada a tendência natural à formação de novos núcleos de colonização agrícola-pastoril em regiões até então despovoadas.

O número de casos até agora conhecidos não exprime a realidade do problema. Mesmo no interior do Estado de São Paulo, onde a densidade de população rural é das maiores do País, grande é ainda o número de pequenos núcleos praticamente à distância do contrôle direto dos serviços de saúde pública. Entretanto, vários casos de febre maculosa têm sido surpreendidos nestes últimos anos. Êstes, certamente passariam desapercebidos ou seriam rotulados sob outras denominações, não fôra o contato cada vez maior das nossas autoridades sanitárias com o trabalhador rural. O aparecimento de casos da doença entre trabalhadores recém-chegados a certas áreas até então aparentemente indenes, é que, pôr vêzes, desperta a atenção e faz descobrir, por cuidadoso inquérito retrospectivo, a incidência da doença, sem que tivesse sido anteriormente reconhecida e comunicada às autoridades sanitárias.

O combate aos carrapatos, medida altamente dispendiosa e sòmente aplicável a zonas de grande valor econômico, torna impraticável o seu emprêgo na maioria das regiões atingidas. A vacinação repetida constitui o meio mais prático de proteção direta do homem.

A vacina preventiva é cada vez mais solicitada. Apesar de sua produção sempre crescente, a necessidade de proteger as populações dos focos cada vez mais numerosos não tem ultimamente permitido ao nosso Laboratório atender a

todos os pedidos de vacina, quer das autoridades sanitárias do nosso e dos outros Estados, quer de outros serviços médicos, civis e militares ou diretamente de particulares, que já a procuram espontaneamente.

O interêsse ultimamente manifestado por investigadores de diversas instituições científicas no sentido de conhecerem detalhes dos métodos de trabalho usados no Instituto Butantan para o preparo da vacina preventiva contra a febre maculosa e, principalmente, as técnicas de criação e manuseio de Ixodidas, induziu-nos a publicar êste artigo de divulgação (*).

Descreveremos, assim, neste trabalho, as instalações, métodos e técnicas especializadas, que vimos aperfeiçoando e adaptando às nossas condições de trabalho no decorrer dos últimos anos.

Alguma experiência adquirida no constante manuseio de Ixodidas, utilizando a técnica padrão de Spencer-Parker, permitiu-nos igualmente adotar na rotina modificações que julgamos proveitosas na execução de certos detalhes técnicos. Essas modificações referem-se aos métodos de criação dos Ixodidas e aos meios de proteção de que nos servimos para conseguir segurança e eficiência nos serviços.

No intuito de tornar facilmente reproduzíveis os diversos métodos utilizados, objetivamos por meio de desenhos e fotografias todas as fases da técnica.

Relataremos, igualmente, alguns dados sôbre a biologia do *Amblyomma cajennense*, desde que diretamente se relacionem com as diversas fases do preparo da vacina. Detalhes mais completos sôbre a biologia dêste Ixodida, atualmente em estudo em nosso Laboratório, serão oportunamente publicados.

B — CONSIDERAÇÕES SÔBRE AS VACINAS CONTRA AS RIQUÉTSIOSES

Antes de definitivamente firmada a importância e significação etiológica das riquétsias, não foram satisfatórios os resultados das inúmeras tentativas feitas com o fim de serem obtidas vacinas preventivas contra as diversas doenças tifo-exantemáticas.

As vacinas preparadas com emulsões de órgãos de animais infetados, pobres em riquétsias, aquecidas ou tratadas por vários agentes químicos, não se mostravam antigénicas. Só vacinas preparadas com virus-tecido vivo, em doses sub-infetantes, ou com o emprêgo de amostras de pouca virulência, atenuadas por processos especiais (vacina de Blanc e Laigret) revelaram-se eficientes. Essas vacinas, de difícil contrôle, não são entretanto recomendáveis para aplicação generalizada.

(*) Esta descrição, não é sinão uma simples adaptação do protocolo geral das técnicas empregadas no Instituto Butantan e obrigatoriamente feitas em cada serviço.

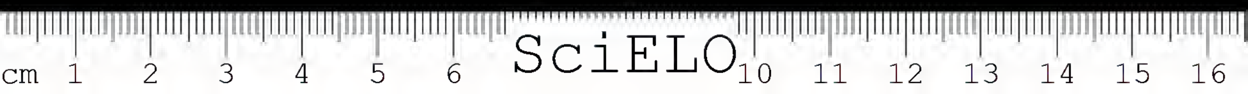




Fig. 1
Distribuição da febre maculosa no Estado de São Paulo, até novembro de 1943.

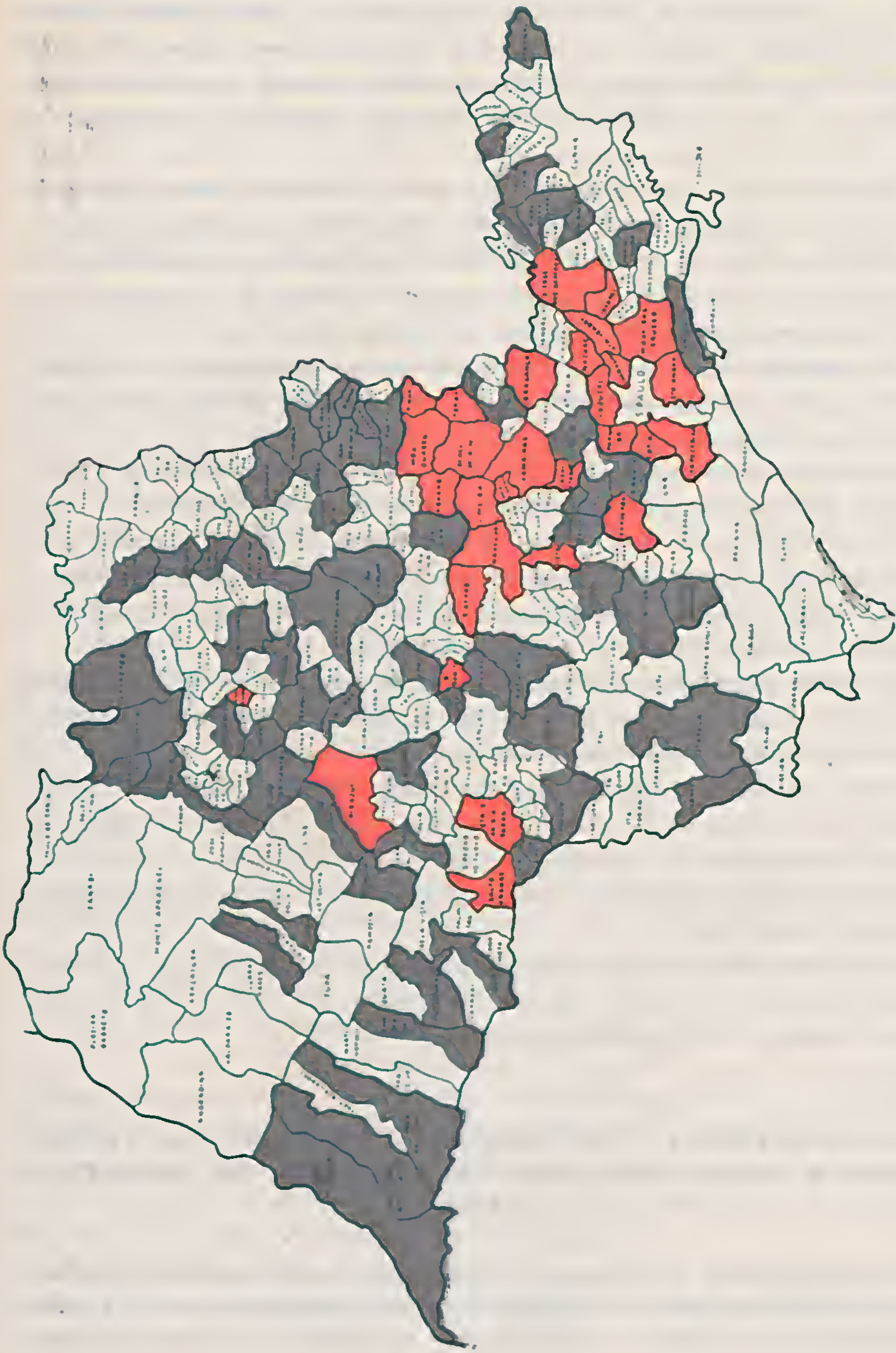


Fig. 2

Municípios nos quais se verificaram reações de *Weil-Felix* positivos: Em vermelho, casos fatais de febre maculosa; em escuro, sem comprovação definitiva.

5

O uso de vacinas ricas em riquétsias, mortas por agentes quimicos, teve origem nas experiências de ROCHA LIMA (3), que deu, desde o início, significação etiológica à riquétsia. O achado de grandes massas dêsses elementos nos tecidos de piolhos infetados levou-o a utilizar material proveniente dêsses vetores para fins de imunização. Suas primeiras experiências mostraram o acêrto dessa orientação.

WEIGL (4, 5, 6), posteriormente, por meio de delicada técnica, conseguiu criar piolhos em grande número, infetá-los artificialmente e preparar uma vacina fenolada, muito rica em riquétsias, dotada de eficiente valor antigênico.

SPENCER e PARKER (7) utilizaram também triturados de *Dermacentor andersoni* previamente infetado, para obter uma vacina preventiva.

Em consequência dêsses fatos ficou, pelo menos aparentemente, estabelecida uma estreita relação quantitativa entre o número de riquétsias contidas em uma vacina e o seu valor vacinante.

Nestes últimos anos, por meio de outros processos de obtenção de suspensões ricas em riquétsias, pôde-se preparar vacinas fenoladas eficientes.

Aos métodos iniciais de ZINSSER e colaboradores (8 a 13) (raspados peritoneais de ratos tratados pelo benzol ou irradiados pelos raios X) juntaram-se os mais recentes de CASTAÑEDA (14), que obteve riquétsias, em grande número, de pulmão de animais inoculados por via respiratória.

Do mesmo modo, pelos métodos de cultura de riquétsias em tecidos, também foram obtidas emulsões antigênicas, ricas em riquétsias. Dêstes últimos destaca-se o de COX (15), de cultivo na vitelina de embrião de galinha.

Assim, por meio de três métodos são obtidos hoje antigenos ricos em riquétsias para o preparo de vacinas preventivas contra doenças tifo-exantemáticas: a) por cultura de riquétsias nos artrópodos vetores; b) por cultura nos pulmões de animais inoculados por via respiratória; e c) por cultura na vitelina do embrião de galinha.

O primeiro dêles é o presentemente adotado na rotina de nosso Laboratório para o preparo da vacina contra a febre maculosa. Os dois outros estão ainda em estudos e observações experimentais.

C — O *AMBLYOMMA CAJENNENSE* E O PREPARO DA VACINA CONTRA A FEBRE MACULOSA PELA TÉCNICA DE SPENCER E PARKER

Os característicos clínicos e anátomo-patológicos, a alta mortalidade aliada a uma morbidade reduzida, a ocorrência em zonas rurais ou semi-rurais, a transmissibilidade por Ixodidas, o comportamento experimental do agente infetante

e, sobretudo, as provas de imunidade cruzada permitiram identificar o então chamado "tifo exantemático de São Paulo" à febre maculosa das Montanhas Rochosas. Êste fato possibilitou adotar entre nós as medidas profiláticas já amplamente estudadas e aplicadas por SPENCER e PARKER nos Estados Unidos. Adaptadas ao nosso meio, essas medidas foram aconselhadas por uma comissão nomeada em novembro de 1933 pelo diretor do Departamento de Saúde do Estado e visavam o combate ao vetor — o carrapato — e a vacinação preventiva.

LEMOS MONTEIRO, em trabalho apresentado à 9a. Reunião da Sociedade Argentina de Patologia Regional do Norte, reunida em Mendoza nos primeiros dias de outubro de 1935 (16), relatou os métodos a serem usados na profilaxia racional e prática da infecção, dando à vacinação preventiva o principal papel. Aconselhou, para o preparo da vacina, a técnica de SPENCER e PARKER, considerando como problema inicial a ser resolvido, a criação em larga escala do Amblyomma cajennense. Com efeito, LEMOS MONTEIRO demonstrou que o *Ambliomma cajennense*, além de ser um ótimo vetor da infecção (17, 18, 19), os seus órgãos apresentam grande número de riquétsias com as quais se pode preparar uma vacina do tipo americano.

A infecção acidental e fatal de que foram vítimas êsse experimentador e o seu auxiliar, EDISON DIAS, interrompeu bruscamente as suas atividades.

Em janeiro de 1936, um de nós assumiu a direção dos serviços de febre maculosa do Instituto Butantan, tendo a preocupação inicial de criar o *Amblyomma cajennense* em grande número, com o fim de preparar a vacina pelo método mais aconselhável no momento, preparando para isso aparelhagem e instalações indispensáveis ao bom êxito do empreendimento e o mais possível a coberto de novos acidentes.

Embora, na ocasião em que publicara aquêle trabalho a que nos referimos, LEMOS MONTEIRO não tivesse ainda conseguido observar nenhum exemplar de *Amblyomma cajennense* naturalmente infetado, já havia informes clínicos de PIZA, MEYER e GOMES sôbre a presença de carrapatos desta espécie, fixados em doentes de febre maculosa.

O encontro de *Amblyomma striatum* naturalmente infetado, primeiramente por SALLES GOMES (20) e posteriormente por TRAVASSOS (21 a 27), assim como os resultados concludentes de MONTEIRO e colaboradores sôbre a transmissão experimental da febre maculosa pela espécie *Amblyomma cajennense* e ampliados para as espécies *Amblyomma striatum*, *Amblyomma brasiliensis* e *Amblyomma cooperi*, firmaram de modo definitivo a transmissibilidade da febre maculosa entre nós por algumas espécies do gênero *Amblyomma*.

Decorridos alguns anos de pesquisas intensivas com Ixodidas capturados em vários focos da doença em São Paulo, pudemos encontrar ultimamente vários exemplares de *Amblyomma cajennense* naturalmente infetados. Êstes exames



positivos não só foram obtidos com exemplares adultos, como com larvas e ninfas, estas últimas cuidadosamente estudadas e identificadas após a terminação do ciclo em laboratório.

O fato de ter sido o *Amblyomma striatum* o primeiro Ixodida encontrado naturalmente infetado em São Paulo, fez com que êle fosse focalizado como a espécie de escolha para o preparo da vacina. Contudo, por ser o *Amblyomma cajennense* mais abundante *in natura*, mais facilmente criado no laboratório e em seus órgãos ter sido evidenciada a abundante reprodução de riquétsias, foi êste último o escolhido. Agora, os nossos recentes resultados positivos de infecção natural vêm mostrar quão acertada foi essa escolha.

O estudo minucioso da infecção experimental do *Amblyomma cajennense* evidencia que, tal como no caso do *Dermacentor andersoni*, o agente infetante se reproduz no seu organismo e se transmite também congenitamente às gerações seguintes.

As riquétsias no Ixodida infetado podem ser encontradas nas células dos tecidos dos órgãos internos. Em cortes histológicos, têm sido evidenciadas riquétsias em grande número principalmente nas células epiteliais dos divertículos intestinais, na sua maior parte de localização intracelular (19).

A infecção do Ixodida é relativamente fácil, bastando para isso uma alimentação de algumas horas em animal infetado. Com uma única alimentação de exemplares adultos, seguida de intervalos de cêrca de 8-12 dias à temperatura ambiente, Lemos Monteiro conseguiu após trituração dêsses carapatos preparar uma emulsão fenolada vacinante para cobaia. Resultados mais regulares em capacidade vacinante, porém, são obtidos quando se utilizam emulsões de adultos conseguidos por criação artificial no laboratório, alimentando-os nas fases anteriores de larva e ninfa, em animais infetados. A infecção processa-se de modo relativamente fácil, quando os Ixodidas são colocados a sugar coelhos ou cobaias infetados no momento propício, isto é, na fase de reação febril.

D — PESSOAL E INSTALAÇÕES

Dado o perigo a que estão sujeitos os que manuseiam o material infetante necessário ao preparo da vacina, torna-se indispensável escolher cuidadosamente os auxiliares, especialmente aquêles que se destinam a trabalhar na criação dos Ixodidas. Deve-se dar preferência aos mais calmos e habilidosos, possuidores de suficiente prática de trabalhos com material infetante. Serão instruidos detalhadamente sôbre os diferentes modos pelos quais se podem contaminar, exigindo-se dêles treino prévio, técnica acurada na manipulação e cuidados especiais de inspeção do seu próprio corpo antes e depois de encetar os trabalhos com Ixodidas.

As infecções durante os trabalhos de laboratório são geralmente devidas:

a) a acidentes por ocasião das manipulações de animais infetados: inoculações, necropsias, colheitas de material; ou devidos a descuidos no manuseio de recipientes contendo material infetante;

b) à picada de Ixodidas infetados;

c) ao esmagamento de Ixodidas infetados ou de outros hematófagos (repletos de sangue de animais infetados) entre os dedos, sujando-os com material infetante e permitindo a infecção pelas escoriações cutâneas ou pelas mucosas;

d) à inspiração de partículas desprendidas por ocasião da trituração de Ixodidas ou em consequência do manuseio de recipientes contendo ou que contiveram hematófagos infetados, cujas fezes e outros detritos dessecados podem, ao se desprenderem, ser aspirados.

Os cuidados exigidos são:

a) vacinar todos os auxiliares com 3 doses de 2 cm^3 da vacina ao serem admitidos ao serviço. Revacinar cada 3 ou 4 meses com uma dose-estímulo de 2 cm^3;

b) os auxiliares ao chegarem ao serviço, despirão todas as roupas de uso externo e vestirão aventais apropriados;

c) trabalhar com as mãos protegidas com luvas quando se manipulam animais ou com qualquer outro material infetado;

d) triturações e manipulações com material infetante serão sempre feitas nas caixas envidraçadas de proteção;

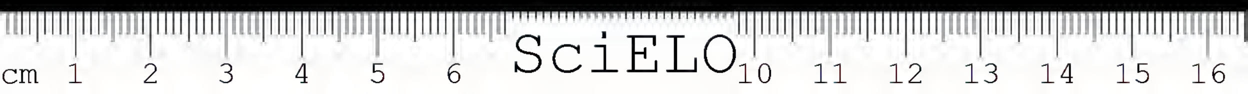
e) nos trabalhos com Ixodidas serão utilizadas mesas protetoras, obedecendo-se rigorosamente à técnica estabelecida;

f) à saída do serviço, os auxiliares farão inspeção do seu próprio corpo em espelhos adequados, prevenindo imediatamente o chefe dos auxiliares no caso de encontrarem algum Ixodida fixado ou não;

g) esterilizar os aventais diariamente após terminar o serviço. As luvas usadas devem ficar mergulhadas em solução desinfetante.

Os serviços técnicos devem dispor de instalações especializadas, distribuidas em espaço adequado. Êsse espaço deve ser suficientemente amplo para permitir desembaraço nas manipulações técnicas, evitando acúmulo de material e dos funcionários, sempre prejudiciais e quase sempre causas de acidentes.

O Instituto Butantan dispõe de um pavilhão — Pavilhão Lemos Monteiro — para os serviços da Seção de Virus. O andar térreo dêste Pavilhão destina-se



exclusivamente ao estudo das riquetsioses e nêle estão instalados os serviços técnicos de preparo da vacina contra a febre maculosa.

A planta anexa mostra as instalações e distribuição dos serviços no pavimento térreo. A única comunicação que liga diretamente o edifício com o exterior dá

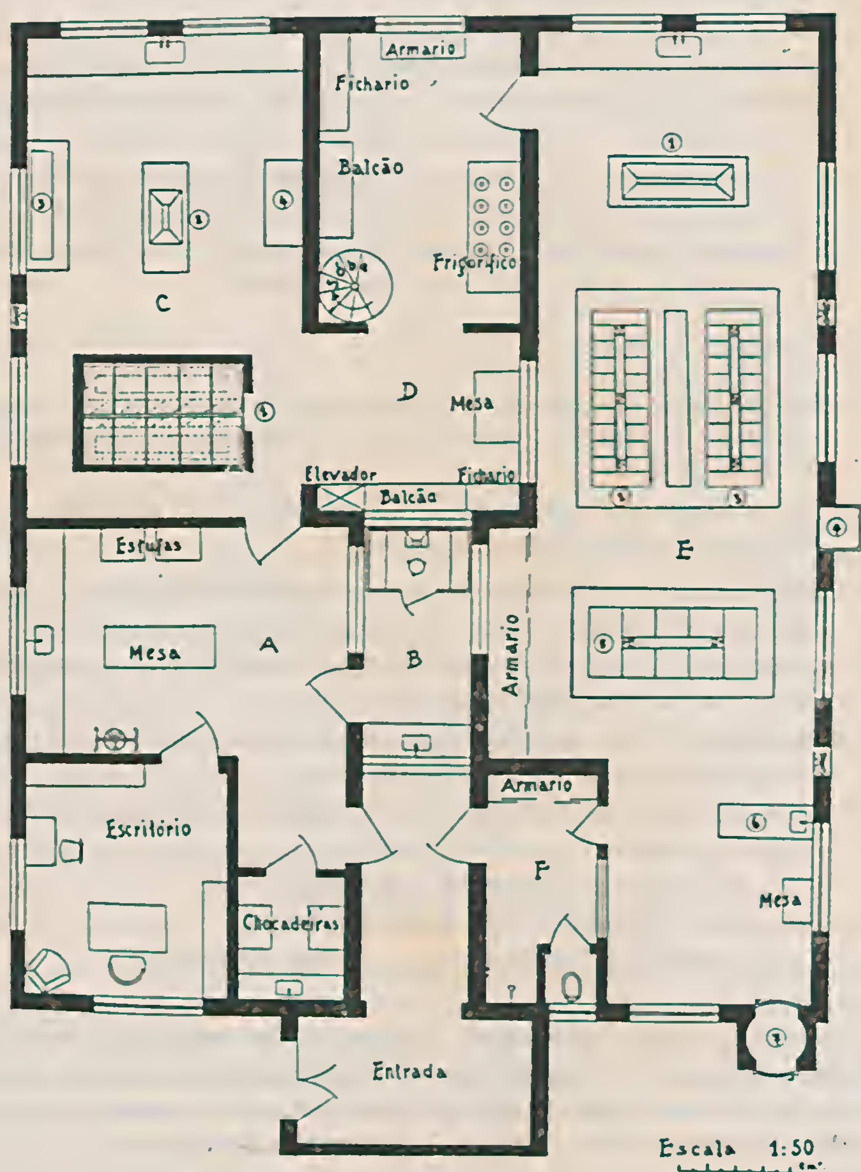


FIG. 3
Planta do andar térreo do Pavilhão Lemos Monteiro. Serviço de febre maculosa.

acesso a uma entrada, onde está o vestiário geral utilizado pelos auxiliares antes de entrarem nos laboratórios propriamente ditos. Esta entrada comunica-se por meio de um corredor, à direita, com outro vestiário (F), ante-sala do biotério. Aí estão armários individuais, instalações sanitárias, chuveiro, jôgo triplo de espelhos e estufa para descarrapatização eventual dos "over-alls", que deverão ser utilizados por todos os auxiliares antes de entrarem nos diversos laboratórios ou no salão dos biotérios. Do lado esquerdo, o corredor comunica-se diretamente com o escritório e laboratórios (A), onde não são manipulados Ixodidas. Êstes laboratórios, destinados a estudos bacteriológicos e sorológicos correlatos ao problema, contrôle da vacina, etc., estão igualmente aparelhados para trabalhos experimentais de culturas em tecido ou em embriões de galinha (B). O restante da parte esquerda do pavimento térreo constitui a sala de criação de carrapatos (C), contando com uma grande câmara-estufa (C 1), armários (C 3), geladeiras (C 4) e mesas de manipulações (C 2).

Toda a ala direita (E) compreende um grande salão destinado aos biotérios (E 2, 3 e 5), contando com dispositivos para facilitar a alimentação de Ixodidas. Aí estão mesas de proteção (E 1) e de necrópsias (E 6), além de um forno crematório para a incineração dos animais (E 7). Os alimentos destinados aos animais que permanecem no biotério, são depositados em uma caixa especial (E 4), comunicável com o exterior, a fim de evitar a entrada de funcionários estranhos aos serviços de biotérios.

Na parte central (D) estão instalados os frigoríficos para a conservação dos virus, bem como mesa e fichários de contrôle dos animais usados nas experiências em curso ou nos trabalhos de rotina. No centro da sala de contrôle um elevador permite a comunicação com o andar superior do "Pavilhão Lemos Monteiro", onde estão instalados os serviços de virus em geral, cuja seção de preparo e esterilização de material fornece todos os aparelhos ou demais utensílios de uso.

Esta distribuição foi feita em obediência a requisitos técnicos que julgamos de valia para o maior rendimento dos serviços, bem como à necessidade de aproveitar ao máximo o reduzido espaço de que podíamos dispor.

Os detalhes das instalações dêsses diversos laboratórios serão descritos a seguir e à medida que nos ocupamos das diversas fases do preparo da vacina.

E — AMBLYOMMA CAJENNENSE CICLO EVOLUTIVO E IDENTIFICAÇÃO

A zona de distribuição do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) compreende toda a América do Sul e Central, podendo ser encontrado no sul da



América do Norte, muito mais freqüentemente, porém, nas zonas relativamente quentes. E' um dos Ixodidas mais freqüentes no Brasil. De parasitismo extremamente eclético, êle pode ser visto fixado em animais de sangue quente, como em alguns de sangue frio. Quando adulto, parasita principalmente o cavalo, o boi e o cão. O seu hospedeiro habitual é o cavalo. Tem sido também encontrado nos seguintes animais: carneiro, cabra, porco e porco do mato, veado, capivara, cachorro do mato, coelho, cotia, tatú, tamanduá-bandeira e outros.

1. Ciclo evolutivo.

O *Amblyomma cajennense* faz um ciclo evolutivo que conta com quatro estádios diferentes: ovo, larva, ninfa e adulto. As larvas e ninfas distinguem-se dos adultos não só pelas dimensões, como também pela ausência do orifício genital.

A larva diferencia-se da ninfa por seu menor tamanho e pelo fato de ser hexápoda. A ninfa é octópoda. E' conhecida entre nós pelas denominações populares de "micuim", "carrapato pólvora", "carrapato fogo", além de outras, peculiares a cada região.

A ninfa é comumente chamada de "carrapatinho", denominação que o povo dá igualmente à larva. ARAGÃO aconselha manter essa denominação somente para a ninfa.

Os adultos são mais conhecidos pelos nomes de "carrapato rodoleiro" e principalmente "carrapato estrêla".

Somente na fase adulta distinguem-se os sexos: na fêmea, o escudo cobre somente a parte anterior do dorso e no macho inteiramente.

A fêmea, no momento propicio, fixa-se ao hospedeiro, e inicia a sua alimentação. Aos poucos aumenta de volume e, ao fim de alguns dias, repleta de sangue e distendida ao máximo, desprende-se do animal caindo ao solo. Procura uma cobertura protetora em algum vegetal próximo e ai inicia dentro de poucos dias a postura dos ovos.

Decorridas algumas semanas e após a eclosão dos ovos, saem as larvas que esperam o momento propicio para atingir um hospedeiro ao seu alcance para se alimentarem.

Após alguns dias de alimentação, desprendem-se do animal, caem ao sólo e transformam-se, dentro de alguns dias, em ninfas, procedendo-se assim, a 1.ª fase da metamorfose.

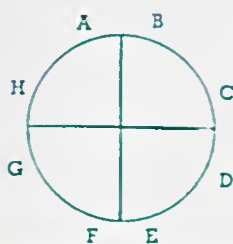
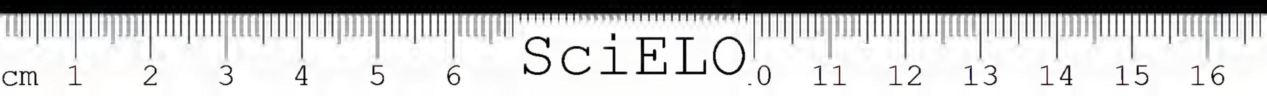


Fig. 4

Ciclo evolutivo do *A. cajennense*. Criação artificial em coelhos.

A — ♂ adulto
B — ♀ adulta e não alimentada
C — ♀ adulta alimentada
D — ovos
E — larvas
F — larvas alimentadas
G — ninfas não alimentadas
H — ninfas alimentadas
(→ alimentação em coelho
→ ecdise


SciELO

Estas, novamente, procuram alimentar-se em um novo hospedeiro, antes de se transformarem (2.ª metamorfose) na fase final de maturidade sexual, em carrapato adulto. Com a alimentação da fêmea, em um terceiro hospedeiro, inicia-se novo ciclo evolutivo.

Como vemos por essas resumidas noções gerais sôbre o ciclo evolutivo do *Amblyomma cajennense*, esta espécie vetora da febre maculosa, além de exigir três hospedeiros para a sua evolução, faz todas as fases de sua metamorfose fora dos mesmos. Êste fato, aliado à indiferença com que ataca os diversos animais e mesmo o homem, permite que, uma vez infetado em qualquer de suas fases evolutivas, já na seguinte possa o Ixodida inocular o material infetante em outro animal ou, acidentalmente, ao homem.

2. Identificação.

Incluimos aqui os caracteres genéricos e especificos de acôrdo com a descrição de Robinson (28) e que correspondem aos da espécie com que trabalhamos:

Caracteres genéricos:

"Metastriata, isto é, sulcos anais em tôrno do anus de situação posterior; geralmente ornados com manchas escuras e listras sôbre fundo pálido; olhos e festões presentes. Palpos geralmente longos, o 2.º articulo mais longo do que os demais. Os capitulos basais são de forma variável. Os exemplares machos não possuem escudos adanais, porém frequentemente têm placas ventrais. Espiráculos subtriangulares ou em forma de vírgula.

Espécie tipo: *Amblyomma cajennense* (Fabricius)."

Caracteres específicos:

"*Macho.*

Diagnóstico: Carrapato pequeno ou de tamanho médio, com a ornamentação caraterística no escudo, formada por manchas ou listras vermelho-pardacentas sôbre fundo pálido; sulco marginal continuo; sulco cervical curto e profundo, sigmóide; patas de colorido pálido, coxa I com dois espinhos fortes, dos quais o externo mais longo e mais afilado; um espinho saliente e ponteagudo nas coxas II e IV; espinho longo, robusto e afilado na coxa IV."

Fêmea.

Diagnóstico: Escudo triangular, arredondado anteriormente, com o ângulo posterior de largura moderada, ornado com manchas vermelho-pardacentas sôbre fundo pálido; sulcos cervicais curtos, profundos e sigmóides, numerosas pontuações de tamanho médio uniformemente distribuidas; coxa I com dois es-

pinhos de pontas desiguais; coxas II e III com espinho saliente ponteagudo, coxa IV com um único espinho curto, rombo e arredondado, pouco mais longo do que largo; festões sempre com pequeno tubérculo no lado ventral, no ângulo póstero-interno."

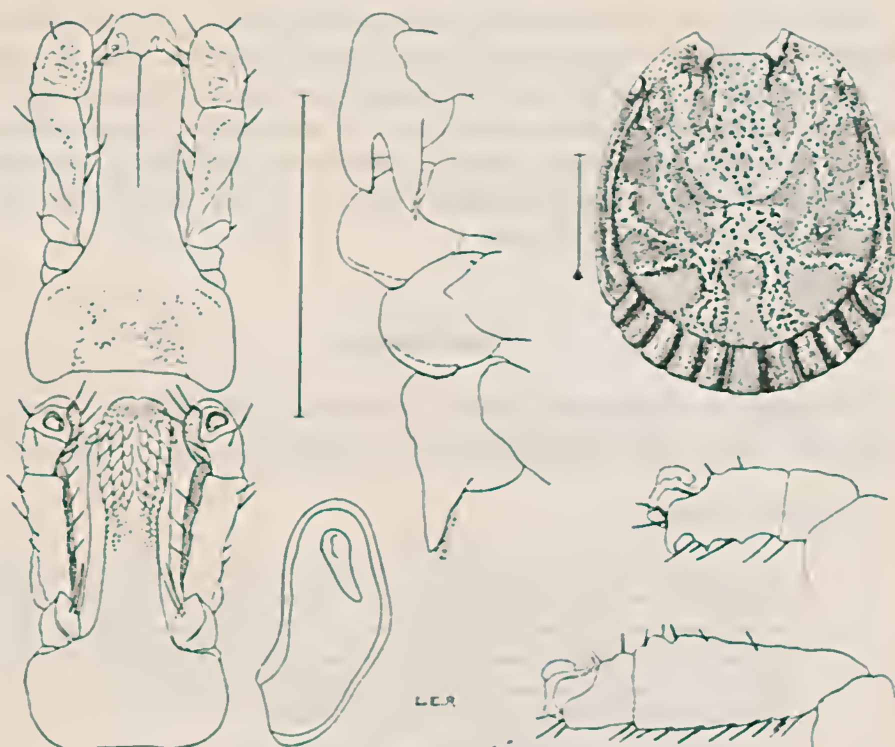


Fig. 5
Amblyomma cajennense, ♂. Escudo, aspecto dorsal e ventral do capitulo, coxas I a IV, tarsos I e IV (segundo Robinson *in* "The genus *Amblyomma*").

Robinson, em sua monografia "The genus *Amblyomma*" (28), ao descrever a espécie *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) coloca a *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, em sinonimia. Entretanto recentemente Rondelli (29) admite a possibilidade de ser *Amblyomma sculptum* considerado espécie afim ou variedade de *Amblyomma cajennense*. Sugere ainda Rondelli, dada a grande difusão desta última espécie, que o pequeno número de casos de febre maculosa em S. Paulo deva correr por conta da raridade relativa de *A. sculptum* ou de outra qualquer das pretensas espécies que revalida ou descreve e que poderiam ser os verdadeiros vetores da riquetsiose.

Não nos parece estar a razão com Rondelli, pois ainda admitindo a multiplicidade de espécies, as verificações de infecção e de transmissão até agora

feitas não só com outras espécies de Ixodidas do gênero *Amblyomma* (*A. striatum*, *A. brasiliense* e *A. cooperi*), como com espécies de outros gêneros, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, são demonstrativas de que todas se infetam facilmente e transmitem com muita regularidade a infecção a animais. Do mesmo modo que

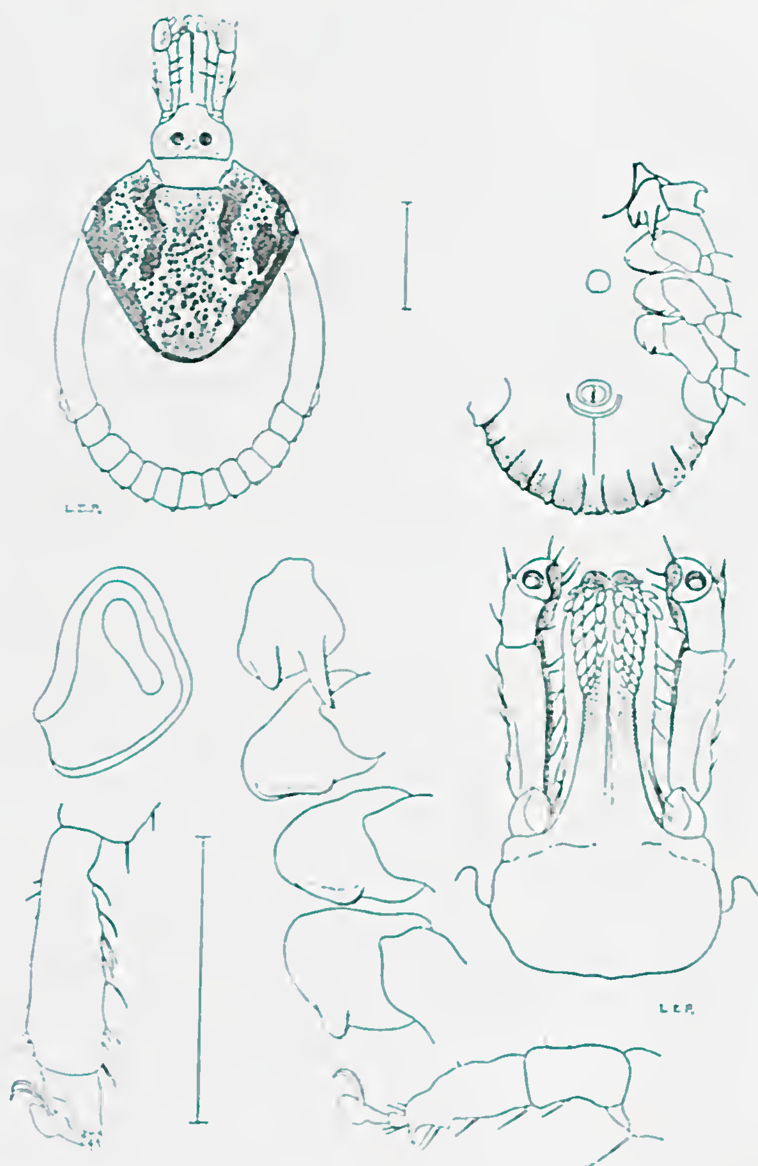


FIG. 6

Amblyomma cajennense, ♀. Face dorsal e ventral, aspecto do capitulo, espiráculo, coxas I a IV, tarsos I e IV (segundo ROBINSON *in* "The genus *Amblyomma*").

Amblyomma cajennense, todas as demais espécies citadas acima transmitem a infecção de estágio a estágio de sua evolução. Desta sorte, parece-nos que pelo menos as espécies citadas do gênero *Amblyomma*, parasitos dos animais de sangue quente, podem, quiçá indiferentemente, infetar-se e transmitir a riquétsia da febre



Fig. 7
Exemplares de *Amblyomma cajennense*, ♂ e ♀, face dorsal e ventral.

maculosa. Não podemos, assim, aceitar a sugestão de Ronde li, que, confundindo um simples índice baixo de infecção natural do *Amblyomma cajennense*, tal como se dá também com o *Dermacentor andersoni* nos Estados Unidos, sugere uma "imunidade" para essa espécie em relação à febre maculosa e empresta a uma suposta variedade caraterísticos especiais de infecciosidade e transmissibilidade.

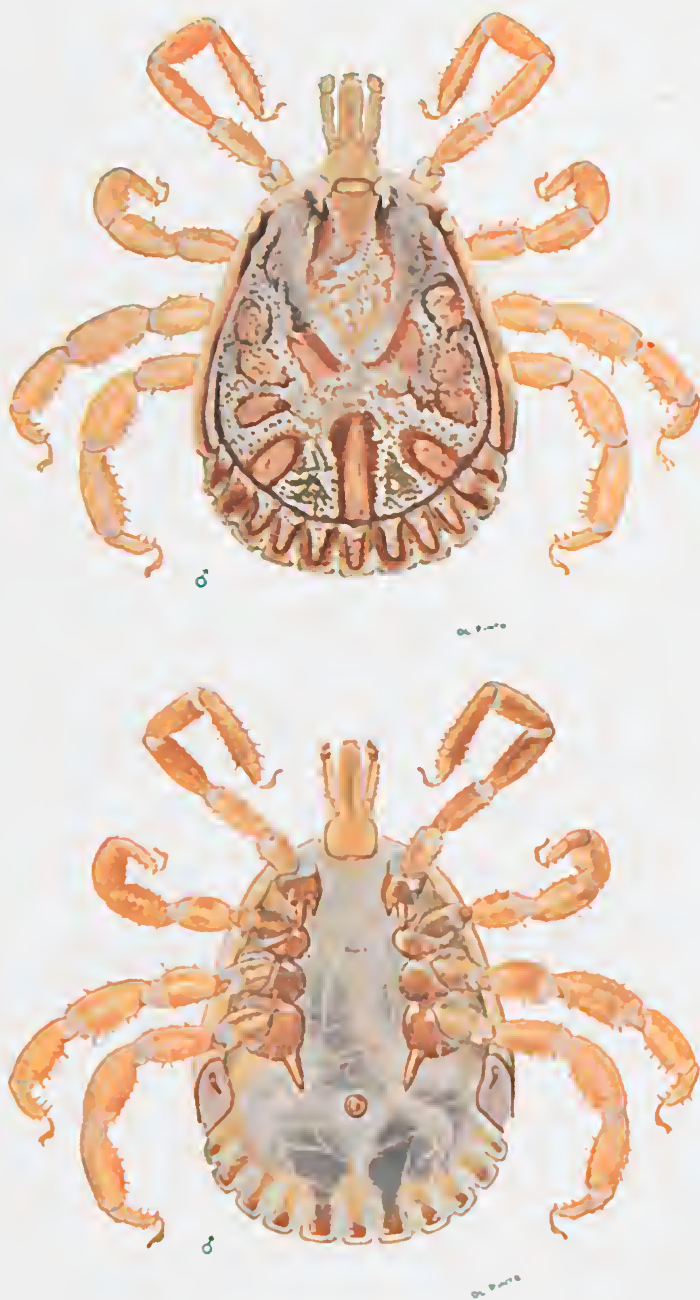


Fig. 8
Amblyomma cajennense, ♂. Face dorsal e ventral.


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO .0 11 12 13 14 15 16

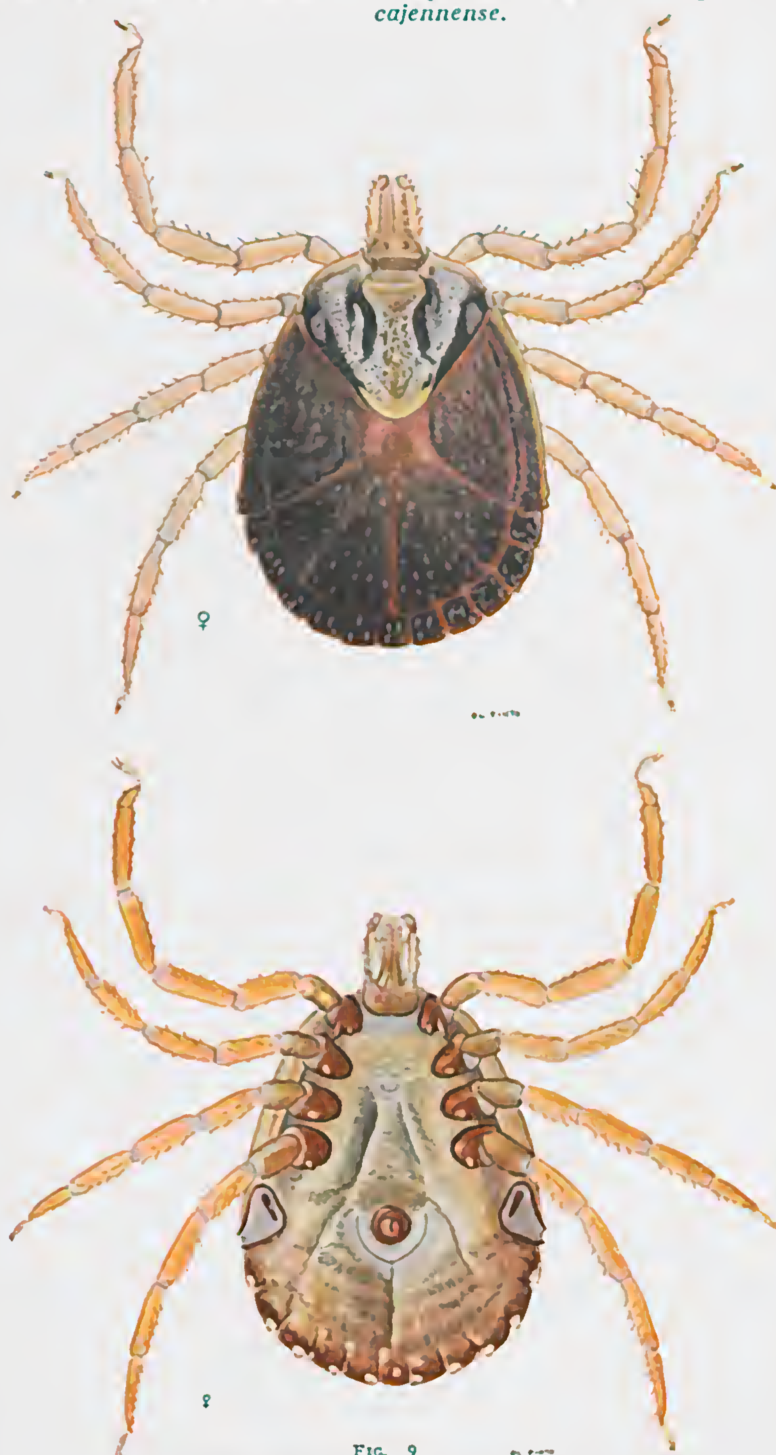
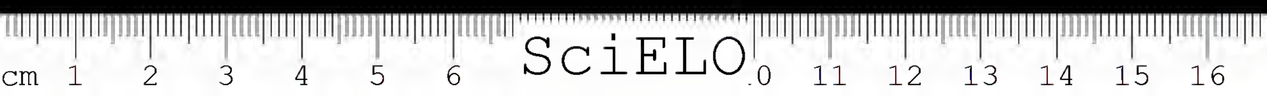


Fig. 9
Amblyomma cajennense, ♀. Face dorsal e ventral.


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

Os dados diferenciais utilizados por Rondelli para justificar a validade destas pretensas espécies, não nos parecem igualmente suficientes; acreditamos mesmo terem sido o resultado de estudos feitos em pequeno número de exemplares, todos conservados. A variação de dimensões entre Ixodidas da espécie *Amblyomma cajennense* é muito grande, mesmo quando se examinam adultos provenientes de u'a mesma geração de ovos. Temos, por exemplo, largamente verificado que u'a maior ou menor sucção de sangue pelas ninfas de u'a mesma geração tem decisiva influência sôbre o tamanho do adulto correspondente, e naturalmente, sôbre o de partes de sua estrutura, como, por exemplo, o escudo que apresenta modificações de forma e tamanho provavelmente da mesma natureza das que serviram àquela autora para diferenciar as espécies *mixtum*, *sculptum*, *tapiri* e *finitimum.*

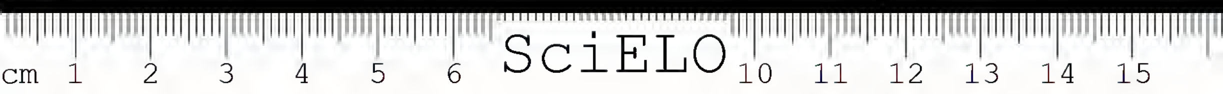
Não cabem aqui argumentações mais extensas a êste respeito. Entretanto, para que não surjam futuras dúvidas sôbre a espécie com que trabalhamos, incluimos propositadamente a descrição dos caraterísticos principais, constantemente encontrados nas muitas gerações de *Amblyomma cajennense* conseguidas com a finalidade de preparar a vacina e oriundas de fêmeas colhidas em diferentes locais do Estado de São Paulo, inclusive em focos de febre maculosa, onde têm sido encontrados Ixodidas naturalmente infetados. Os desenhos de exemplares adultos vistos pela face ventral e dorsal obtidos de Ixodidas vivos, são aqui incluidos com o fim de orientar e facilitar a sua identificação.

F — *AMBLYOMMA CAJENNENSE* — CRIAÇÃO ARTIFICIAL

1. Colheita das fêmeas. Fecundação.

A criação artificial do *Amblyomma cajennense* é feita em nosso laboratório a partir de exemplares adultos fêmeos, obtidos anualmente em grande número nos meses de outubro a março em equinos soltos durante alguns dias em pastagens. Êsses Ixodidas são colhidos somente quando bem alimentados, repletos de sangue.

Abolimos ultimamente a prática de iniciar a criação a partir de exemplares adultos capturados quando ainda não alimentados, tal como o faz Parker. Nos laboratórios de Montana, onde a vacina é preparada com o *Dermacentor andersoni,* a criação artificial tem início, colhendo-se no campo, por meio de uma bandeira de flanela, grande número de exemplares na fase adulta, antes de se fixarem no hospedeiro, portanto, quando as fêmeas ainda não foram fecundadas, nem alimentadas. A fecundação e alimentação se faz ao colocar êsses Ixodidas (machos e fêmeas) em coelhos, por meio de aparelho especial aplicado ao corpo do animal.



Os coelhos utilizados para êste fim são previamente infetados. As larvas provenientes dos ovos das fêmeas alimentadas, já se mostram assim infetadas.

A técnica por nós usada é vantajosa, não só sob o ponto de vista econômico (menor uso de animais de laboratório), como também pelo fato de se obter maior rendimento em fêmeas bem alimentadas e em estado satisfatório para uma perfeita evolução. Êste fato está principalmente ligado a dois fatores. Em primeiro lugar, apesar da ubiquidade de seu parasitismo, o *Amblyomma cajennense* não é, como no caso do *Dermacentor andersoni*, um carrapato de roedores, pelo contrário, prefere na fase adulta animais de grande porte, especialmente equinos e muares, de modo que a alimentação em roedores (coelhos e cobaias) não é feita de maneira tão rendosa. Em segundo lugar, temos verificado que somente as fêmeas fecundadas alimentam-se de modo satisfatório, o que se processa melhor na natureza. Não trabalhando nesta etapa inicial com larvas já infetadas eliminamos o perigo da manipulação do Ixodida na fase mais perigosa, que exige maiores cuidados técnicos dadas as suas pequenas dimensões.

Constantes verificações feitas em carrapatos parasitando cavalos mostram que a alimentação dos exemplares adultos fêmeos faz-se mais ou menos rapidamente, prolongando-se por 48-72 horas, desde que estejam elas previa ou concomitantemente fecundadas. Os machos procuram em geral as fêmeas quando estas já estão fixadas ao hospedeiro. Somente as que não se mostram em contacto com o macho, podem permanecer fixadas ao cavalo durante vários dias, porém sem que aumentem de volume. Desde que fecundadas, se alimentam completa e rapidamente. Verificamos que os exemplares fêmeos não se alimentam completamente sem que esta condição seja preenchida e que, pelo contrário, a alimentação é sempre rápida e total após a fecundação, não se prolongando geralmente além de 3 a 4 dias.

As fêmeas deverão ser colhidas bem cheias para que desovem a contento. Teoricamente, deveriam ser utilizadas apenas aquelas que após farta alimentação se desprendem espontaneamente dos animais parasitados; na prática, porém, isto é inatingível, devendo-se colher os Ixodidas quando ainda fixos à pele dos cavalos.

Várias pesadas de fêmeas colhidas dêste modo e que foram cuidadosamente observadas quanto ao rendimento da desova, mostram que fêmeas pesando cêrca de 0.5 g já podem ser aproveitadas para início da criação. Deve-se dar preferência, contudo, a fêmeas de maior pêso. Nas colheitas de grande número de fêmeas nos serviços de rotina, são mais freqüentes as de pêso entre 0.75 g a 0.9 g, podendo algumas atingir a mais de 1 grama.

Fixam-se, elas, de preferência, nas regiões mais vascularizadas, como, por exemplo, na parte inferior do animal, no pescoço ou principalmente na face interna e posterior das coxas, onde a epiderme é igualmente menos espêssa.

A colheita de Ixodidas deverá ser cuidadosa. Qualquer lesão poderá ocasionar a morte da fêmea ou a não desova. São principalmente prejudiciais as fraturas do aparelho de sucção, o que pode facilmente acontecer quando se procura por meio de trações bruscas destacar carrapatos fortemente fixados.

As fêmeas quando bem alimentadas, sempre se destacam facilmente. Qualquer auxiliar adquire a prática necessária em pouco tempo, que consiste em fazer manobras suaves de tração no sentido oposto ao da penetração do hipostoma.

Nas observações feitas no decorrer de 1939 sôbre 1.000 fêmeas cheias colhidas por auxiliar inexperto, 94 exemplares (9.%) morreram sem ter iniciado a desova; já na criação de 1942, entre 5.548 exemplares colhidos só no mês de novembro, apenas 308 exemplares (5.5%) morreram ou não desovaram em consequência de defeitos na manobra da colheita. Esta diferença correu, sem dúvida, em parte por conta das precauções tomadas ao destacar os Ixodidas fixados aos cavalos. Seria possível eliminar estas últimas perdas, selecionando as fêmeas bem cheias e desprezando aquelas que ao exame no microscópio entomológico mostrarem lesões do hipostômio.

A época em que *Amblyomma cajennense* é encontrado na fase adulta, inicia-se nos últimos dias de setembro e pode prolongar-se até fins de março. As larvas, pelo contrário, são mais freqüentes nos meses de maio e junho e as ninfas de julho até setembro. Êsses limites não são, entretanto, fixos, pelo contrário, variam largamente nos diferentes localidades do território paulista, variação decorrente, sem dúvida, das diferenças climáticas das respectivas regiões, principalmente das relacionadas com a temperatura e o grau higrométrico. Nas condições de trabalho de criação artificial de Ixodidas em nosso laboratório, êste ciclo se reproduz de maneira aproximada e atingimos a fase adulta dos Ixodidas de nossa criação, quando mantidos à temperatura ambiente, quase sempre nos primeiros dias de setembro.

Os locais em que *Amblyomma cajennense* é encontrado mais freqüentemente são aquêles nos quais abundam eqüinos e muares e onde, igualmente, são preenchidas certas exigências relativamente ao tipo de vegetação, umidade e temperatura.

Há no Estado de São Paulo algumas plantações de eucaliptos, que reunem de maneira ideal, todas as condições propícias à manutenção e reprodução de grande quantidade de Ixodidas. Uma dessas plantações constitui foco bem estudado de febre maculosa e o local tem mesmo a denominação de "carrapatal", tal a quantidade de Ixodidas, principalmente de *Amblyomma cajennense,* ali encontrada. Além da sombra relativa proporcionada pelos eucaliptos que permite manter um estado higrométrico favorável, há abundante vegetação ras-



teira e de arbustos, onde a desova das fêmeas faz-se satisfatoriamente; por outro lado, o grande número de muares e eqüinos usados pelos cortadores de lenha para o transporte, serve de abundante repasto às exigências nutritivas dos carrapatos, de modo a facilitar o seu ciclo evolutivo.

DISPOSITIVOS DE DUPLA PROTEÇÃO PARA A CRIAÇÃO DE IXODIDAS

Após prévia lavagem, seguida de secagem ao ventilador, cada exemplar fêmea é colocado em um dispositivo especial que denominamos "frasco de dupla proteção". Êste dispositivo serve para conter os carrapatos em todas as fases evolutivas e consta de 2 tubos, um menor, chamado "tubo de contenção", no interior do qual são colocados os Ixodidas, e outro maior, servindo de continente do primeiro e denominado "tubo de proteção".

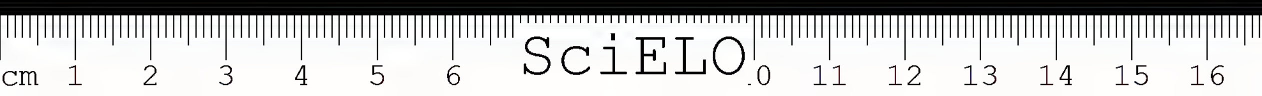
O "tubo de contenção" é um cilindro de vidro, medindo 2.5 cm de diâmetro por 3.5 cm de comprimento e aberto em ambas as extremidades. Uma tampa de alumínio perfeitamente adaptável ao diâmetro dêste tubo, mantém fixa numa das aberturas uma tela de organdi, de malhas suficientemente finas para não permitir a passagem das menores larvas. Esta peça de alumínio é perfurada no centro e fixa-se ao vidro — após adaptar o organdi — por meio de uma camada de parafina, que se aplica aquecida e fundida. A outra extremidade do tubo de contenção é fechada por uma rolha de cortiça recoberta com gase. O tubo fechado dêste modo permitirá a fácil aeração pelas aberturas superiores. A fêmea destinada à criação deverá ser colocada sôbre a gase que cobre a rolha.

Usamos os tubos de contenção assim preparados preferentemente aos fechados em uma extremidade e abertos na outra, porque as nossas verificações têm evidenciado um retardamento considerável do início da saída de larvas, quando são usados os tubos fechados comuns. Acreditamos que o grau de umidade ótimo, agindo mais diretamente sôbre os ovos, facilite e mesmo acelere a evolução.

Colocadas as fêmeas nos "tubos de contenção", êstes são guardados no interior dos "tubos de proteção", que medem 9 cm de comprimento por 3.5 cm de diâmetro e são abertos somente em uma das extremidades. Nêste tubo costumamos colocar uma base de areia de 2 a 2.5 cm de altura, que se molha freqüentemente com água e é destinada a manter a umidade requerida pelo Ixodida. A rolha de cortiça do "tubo de contenção" deve repousar na areia e a gase que envolve poderá assim permanecer úmida, transmitindo umidade ao Ixodida. A contínua evaporização da água da areia mantém no interior de todo o tubo de proteção um grau higrométrico ambiente ótimo.

O "tubo de proteção" é obturado na parte superior por meio de um pedaço de organdi fixado nos bordos externos superiores do tubo por uma tira de esparadrapo. Êste dispositivo permite u'a maior segurança nas manipulações, bem como facilita a manutenção constante da umidade indispensável à boa evolução do Ixodida; igualmente veda a passagem de algum Ixodida, que por qualquer motivo possa transpor o obstáculo constituido pelo "tubo de contenção".

As indicações sôbre data e local da colheita, número de ordem do tubo, bem como quaisquer outros informes, são anotados em ficha especial, onde se registram todos os dados relativos à evolução. No esparadrapo que serve para fixar o pedaço de organdí, ficará anotado apenas o número de ordem correspondente à ficha.



Os frascos de dupla proteção acima descritos, contendo os Ixodidas, são sempre colocados em caixas especiais, que podem receber 42 frascos cada uma. Estas caixas são mantidas em armários de capacidade para 2.100 tubos cada um.



Fig. 10
Tubo de dupla proteção, com o tubo de contenção (menor) e o de proteção (maior).

Apesar da dupla proteção oferecida pelos tubos, o armário, que é de metal para facilitar a limpeza mais rigorosa, repousa em uma bacia que contém solução carrapaticida. Esta precaução impedirá, em caso de acidente, a passagem de carrapatos do armário para o piso da sala.

Todo êste conjunto tem-se mostrado satisfatório para a segurança do trabalho e estas precauções nos parecem de utilidade.

MODIFICAÇÕES NOS APARELHOS USADOS PARA A CRIAÇÃO DE IXODIDAS

Todos os dados sôbre detalhes do ciclo evolutivo do *Amblyomma cajennense* incluidos nêste trabalho, foram obtidos em observações de Ixodidas mantidos no nosso tubo padrão de "dupla proteção". Êste dispositivo parece-nos bastante prático e os resultados de sua aplicação, sem dúvida, são satisfatórios quando o volume da vacina a produzir não é grande. Si, entretanto, se cogita preparar vacina em maior volume, o que requer como ponto de partida muitos milhares de fêmeas alimentadas e não se dispõe de muito pessoal, é de toda

a conveniência alterar as dimensões do aparelho de proteção e reunir em um só vários "tubos de contenção".

Passamos ultimamente a trabalhar com lotes de 50 a 100 tubos de contenção, colocados em um cristalizador de aproximadamente 10 cm de altura. Neste cristalizador, que exerce a função do tubo de proteção, coloca-se, igualmente, a base de areia umedecida até a altura



FIG. 11
Armário com Ixodidas.

de 2 cm. Os tubos contendo carrapatos são dispostos sôbre a areia com a parte fechada pela rolha de cortiça voltada para baixo. Com organdi à prova de larvas preso ao bordo superior do cristalizador por meio de esparadrapo, obtem-se a dupla proteção desejada.

Para simplificar o trabalho, juntam-se no mesmo cristalizador somente Ixodidas da mesma fase evolutiva, colhidos num mesmo dia e nas mesmas condições de alimentação. Procedendo-se dêste modo, pode-se prever com certa segurança, qual o momento propício para a alimentação de todos os exemplares contidos no mesmo aparelho de proteção, desde que sejam bem conhecidos os dados referentes aos períodos de tempo necessários à evolução do carrapato nas suas várias fases.

Outro dispositivo freqüentemente utilizado é o constituido de um tubo contenedor (A) fechado na extremidade inferior com o tecido de organdi (D) e na superoir com uma rolha de cortiça perfurada no centro, de abertura igualmente protegida com tecido à prova de larvas (E). Êste tubo, cilindrico é idêntico ou pouco mais longo do que o tubo padrão de contenção e deverá ficar suspenso pela parte mediana por meio de uma rolha de cortiça, que se adapta à parte superior aberta de um outro tubo (B), de diâmetro ligeiramente maior do que o nosso tubo de proteção. No fundo dêste tubo coloca-se também a indispensável areia umedecida (C).



FIG. 12

Aparelho de dupla proteção, contendo 100 tubinhos com carrapatos.

Os carrapatos mantidos no interior do tubo cilindrico menor e, depositados sôbre o organdi, ficam em ótimas condições de aeração e sofrem a influência benéfica da livre passagem da umidade através do tubo de contenção, sem que sejam umedecidos por contato direto.

Aconselhamos, entretanto, utilizar êste modêlo somente quando se estudam Ixodidas não infetados.

Os inconvenientes que podemos apontar contra o uso generalizado dêste dispositivo no manuseio de carrapatos infetados, são os seguintes: 1) fornece menor segurança do que o nosso tubo de dupla proteção; êste, além da barreira apresentada pelo organdi protetor do tubo de contenção, apresenta novo obstáculo para a saida de Ixodidas, constituido pelo tubo de proteção, fechado com tecido à prova de larvas; 2) facilita na base do tubo de contenção o crescimento de bolores que freqüentemente interferem na evolução normal dos ovos dos carrapatos ou das larvas e ninfas cheias; êste crescimento se verifica à custa do material nutritivo constituido de detritos, principalmente plasma sanguineo, que vem ade-

rente aos carrapatos; 3) nas observações muito prolongadas pode acontecer que o organdi venha a se desfazer devido a ação continuada da umidade e ao crescimento de bolores, acarretando a queda dos Ixodidas no interior do tubo maior. A resistência do organdi poderá ser aumentada, embebendo-o de parafina antes de fixá-lo ao tubo de contenção.

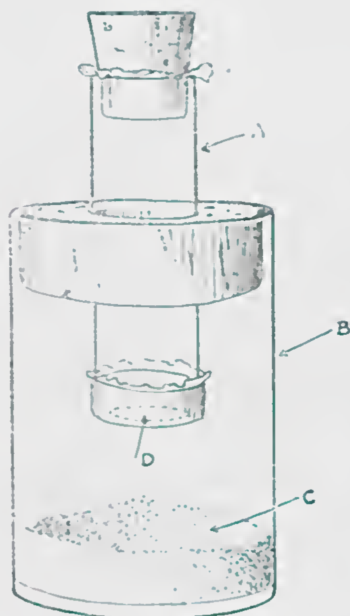


Fig. 13

A — tubo de contenção; B — tubo de proteção; C — areia umidecida; D-E — abertura protegida com organdi.

Nota: Quando, nos cristalizadores de que falamos, se deseja colocar tubos abertos nas duas extremidades, não devem êles ser deixados em contato direto com a areia úmida. Nesse caso, intercala-se entre a superfície da areia e a base dos tubos de contenção uma tela de metal inoxidável, sôbre a qual deverão repousar os tubinhos com os carrapatos.

CÂMARA-ESTUFA PARA IXODIDAS

Colocados os tubos de contenção com Ixodidas no interior dos tubos de proteção, podem êles permanecer ou nos armários já anteriormente citados ou ainda em uma câmara-estufa, de temperatura regulável e umidade constante, de modo a ser possível, quando necessário, apressar a postura e eclosão dos ovos ou facilitar a ecdise de larvas ou ninfas.

A câmara-estufa usada para a criação dos Ixodidas é uma sala com 2.20 m de largura, 3.50 m de comprimento e 2.20 m de altura, completamente fechada por meio de caixilhos de vidro. No seu interior há duas estantes capazes de conter 120 caixas de Ixodidas, correspondendo a 5.040 tubos de dupla proteção.

Estas estantes são de metal e construidas de modo a ficar completamente isoladas das paredes laterais. A base em que se apoiam ao solo é mergulhada em bacias escavadas no assoalho, contendo solução de carrapaticida.

A temperatura da estufa poderá ser regulada à vontade ou mantida constante pelo aparelho automático conectado a uma série de resistências distribuidas em posição apropriada no interior da câmara. O contrôle da umidade é feito por meio de um higrômetro registrador Zeiss. Um pequeno exaustor colocado na parte superior da câmara regula a aeração de combinação com o aparelho regulador da temperatura. No interior da câmara, a temperatura não deve ir além de 26°C. Nossas experiências têm demonstrado, que as temperaturas mais elevadas, si bem que apressem de alguns dias o ciclo evolutivo do carrapato, podem, por vêzes, trazer como consequência um menor rendimento da criação, dada a facilidade com que morrem os Ixodidas que permanecem muito tempo expostos a essas temperaturas, tornando-se necessário manter constante e meticulosa vigilância para evitar perdas desastrosas.

A possibilidade de se controlar até certo ponto a ecdise das larvas, é, sem dúvida, da maior importância, porquanto a colheita de carrapatos no campo pode ser feita somente durante um periodo de tempo relativamente reduzido. Si bem que as fêmeas cheias possam

ser obtidas a partir do mês de setembro até março, a grande maioria é encontrada no curto período de tempo que vai de 15 de dezembro a 30 de janeiro.

Por vêzes, em colheitas satisfatórias chegam ao laboratório num mesmo período de tempo mais de 2.000 fêmeas cheias, colhidas em idênticas circunstâncias. Ora, si todas permanecessem nas mesmas condições de temperatura e umidade, as larvas resultantes teriam de ser alimentadas na mesma ocasião, o que seria pouco prático, não só por exigir grande quantidade de pessoal técnico especializado e instalações mais amplas, como principalmente porque precisariamos contar, no mesmo momento, com grande número de coelhos para alimentar todas estas larvas, sem o que seriam perdidas muitas gerações de Ixodidas.



Fig. 14
Câmara-escura para Ixodidas.

2. Postura dos ovos.

Devemos considerar três períodos:

1. Período prévio à desova (protóquia).
2. Período próprio à desova (cotóquia).
3. Tempo decorrido entre o último dia de desova e a morte da fêmea (metatóquia).

Período prévio à desova (protóquia).

1a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

Mantidas as fêmeas de *Amblyomma cajennense* à temperatura ambiente do laboratório, a desova tem início 5 a 9 dias após a colheita. As fêmeas observadas nesta nossa 1.ª experiência foram todas colhidas quando ainda fixadas nos eqüinos. Os resultados seriam possivelmente diferentes, si fizessemos a mesma observação a partir de exemplares que espontaneamente se desprendem dos cavalos após a alimentação. A variação dos resultados, entretanto, seria insignificante, pois no momento em que procedemos à retirada das fêmeas cheias, elas estão muito próximas a caír espontaneamente.

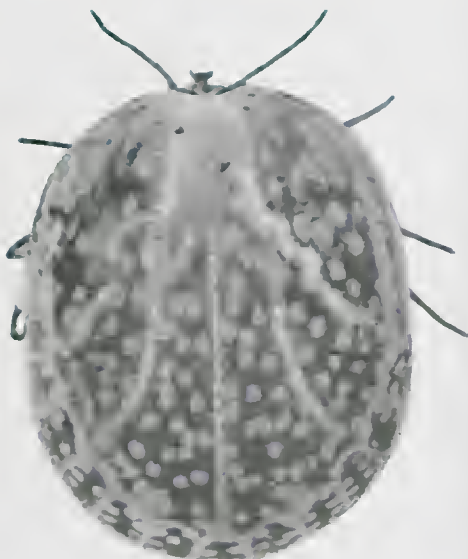


FIG. 15
Amblyomma cajennense, ♀ cheia.

As experiências levadas a têrmo nos anos de 1939, 1941-42 e 1942-43 confirmam os dados estabelecidos para o periodo prévio à desova. Na criação de 1939, por exemplo, fêmeas de *Amblyomma cajennense*, retiradas de cavalos usados nos serviços do Instituto, constituindo três lotes separados, foram levadas ao laboratório logo após a colheita, colocadas no mesmo dia nos tubos individuais de dupla proteção e mantidas à temperatura do laboratório. Ao todo 301 fêmeas iniciaram a desova, ficando os três lotes usados nesta observação assim constituidos:

1.º lote° 35 fêmeas, colhidas a 17-1-39

2.º lote: 114 fêmeas, colhidas a 14-2-39

3.º lote: 152 fêmeas, colhidas a 1-3-39.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

Período prévio à desova (protóquia) (temperatura ambiente)					
Dias	1.º lote	2.º lote	3.º lote	Total	%
4	—	—	6	6	1.99
5	21	2	36	59	19.60
6	9	87	34	130	43.18
7	5	21	24	50	16.61
8	—	4	47	51	16.94
9	—	—	5	5	1.66
Total	55	114	152	301	

As médias das temperaturas registradas nos meses de janeiro, fevereiro e março foram as seguintes:

Meses	média temp. máx.	média temp. mín.	amplitude média	Máxima absoluta	Mínima absoluta
janeiro	26.9	17.3	9.7	31.8	12.9
fevereiro ...	28.9	17.3	11.6	31.9	15.4
março	28.3	17.5	10.8	33.1	15.4

Analisando-se separadamente os resultados das observações em cada lote, que correspondem a carrapatos colhidos em 3 meses diferentes, observa-se que a desova se faz com menor oscilação do período prévio no lote correspondente ao mês de fevereiro, quando entre os dias 5.º e 8.º todos os Ixodidas iniciaram a desova. Nos outros dois lotes, embora a maioria das fêmeas tenha mantido o mesmo período de tempo para início da desova, 5-8 dias, êste, ainda que raramente, foi por vêzes mais precoce ou mais tardio. No conjunto verifica-se que 43.18% das fêmeas iniciou a desova no 6.º dia.

2a. Experiência: Temperatura constante de 26.ºC e umidade relativa de 90%.

Para verificar qual o tempo decorrido entre a colheita e o início da postura de fêmea de *Amblyomma cajennense* mantidas à temperatura constante e umidade controlada, destacamos um grupo de 464 fêmeas colhidas em condições idênticas às referidas na primeira experiência, entre os dias 15-11 e 15-12. Os tubos de dupla proteção, contendo as fêmeas para desova, foram colocados em nossa câmara de criação de Ixodidas, à temperatura de 26.ºC e o grau de umi-

dade relativo a 90%. Nessa observação, o período prévio variou entre 4 e 12 dias, como se pode ver no quadro abaixo:

Período prévio à desova (Protóquia) temperatura 26°C		
Dias	N.° de ixodidas	%
4	3	0.64
5	6	1.29
6	124	26.50
7	214	46.12
8	77	16.59
9	35	7.54
10	3	0.64
11	1	0.21
12	1	0.21
Total	464	

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS

O gráfico comparativo dos resultados obtidos para o período prévio à desova nas condições das duas experiências (Fig. 16), evidencia que não houve diferença muito acentuada. À temperatura ambiente do laboratório, a curva de freqüência percentual, além de ser semelhante e bem uniforme, antecede de um dia a que representa a de temperatura constante. As médias aritméticas são respectivamente $\overline{X_1} = 6.3$ e $X_2 = 7.6$ dias.

3a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

Uma outra observação mais rigorosamente conduzida foi feita ainda êste ano com 100 fêmeas colhidas num mesmo dia em animais provenientes do mesmo local, selecionados em pêso e tamanhos mais ou menos idênticos e mantidas à temperatura ambiente do laboratório, sempre no tubo de dupla proteção

Período prévio à desova (protóquia) Temperatura ambiente. Início da experiência em 27-2-43	
Dias	N.° de carrapatos
5	6
6	28
7	38
8	8
9	19
10	1
Total	100

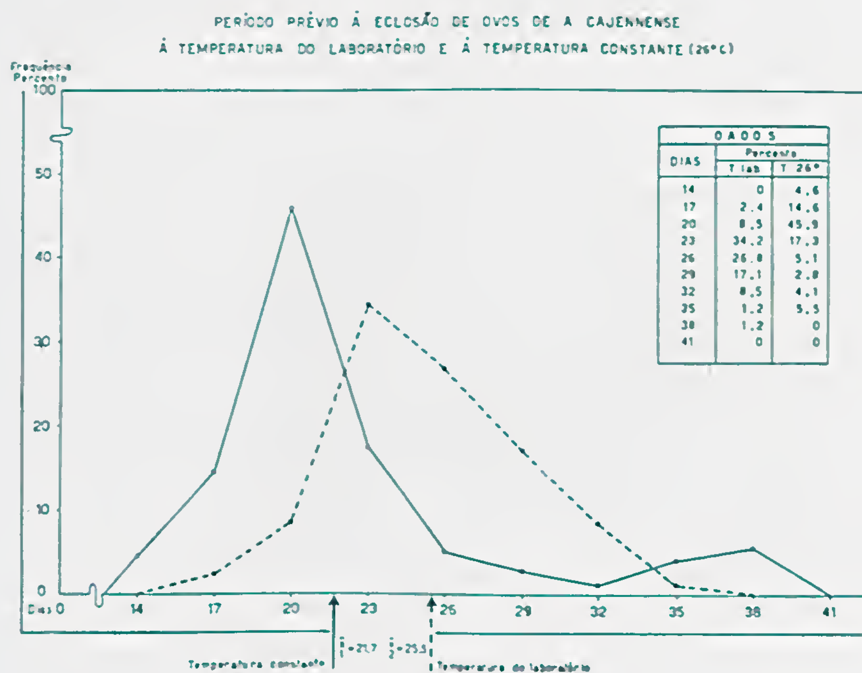


FIG. 16

As temperaturas observadas durante o período da observação foram as seguintes:

Dias	Temperatura máxima	Temperatura mínima	Média
27	28.6	17.3	22.9
28	28.7	15.9	22.3
1	28.4	17.0	22.7
2	28.2	15.5	21.9
3	26.9	15.0	20.9
4	28.0	14.5	21.2
5	28.1	14.9	21.5
6	27.5	16.1	21.8
7	26.9	17.2	22.1
8	24.7	16 5	20.6

Nesta última experiência a maioria das fêmeas (38.0%) iniciou a postura depois de decorridos 7 dias da colheita.

É curioso notar que, selecionadas desta maneira, todas as 100 fêmeas tenham iniciado a desova, o que raramente acontece quando não se usam exemplares escolhidos.

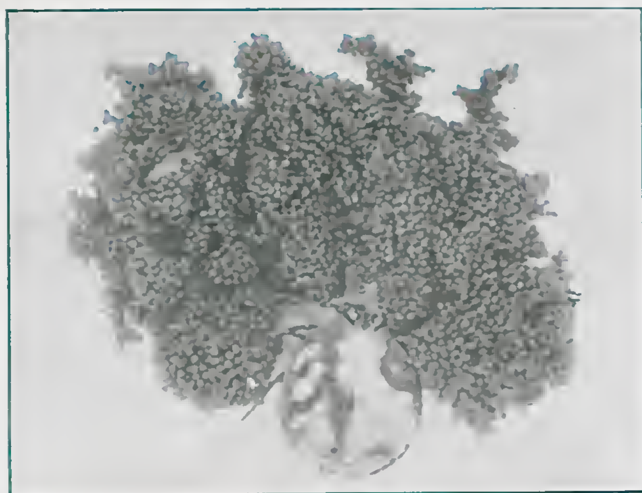


FIG. 17
Amblyomma cajennense, ♀ em desova.

Vê-se, então, a julgar pelas repetidas experiências feitas com diversos grupos de Ixodidas colhidos numa mesma ocasião, que o período prévio à desova por nós observado é aproximadamente a metade do verificado por ROHR (30) à temperatura ambiente (11 a 13 dias) e LEMOS MONTEIRO à temperatura constante de 28.°C (9 a 14 dias). Êste fato deve correr por conta das condições técnicas em que são mantidos os carrapatos em nosso laboratório.

Na fase inicial da criação, a umidade é mantida constante no interior dos tubos que contém os carrapatos, umedecendo-se com freqüência a areia colocada no tubo de proteção. Para esta manobra não se torna necessário retirar a gaze que protege a parte superior do tubo de proteção, bastando fazer escorrer a água pelas paredes laterais internas do organdí.

Período próprio à desova (ovotóquia)

O período próprio à desova, isto é, o tempo decorrido entre o início e o fim da postura dos ovos, é maior do que o período prévio. A postura pode

prolongar-se por período de tempo variável entre 7 a 26 dias, quando as fêmeas permanecem à temperatura de 26.°C e de 10 a 32 dias, quando à temperatura do laboratório.

1a. Experiência: Temperatura e umidades constantes.

O período próprio à desova foi observado numa primeira experiência em 448 fêmeas da criação, iniciada com a colheita feita durante o mês de novembro de 1941, tendo-se tido o cuidado de retirar diariamente de junto de cada fêmea todos os ovos postos no dia anterior, juntando-se num tubo de contenção separado. Esta observação, cujos resultados estão resumidos no quadro anexo, foi feita em carrapatos mantidos à temperatura constante de 26°C.

Período próprio à desova (cotóquia) Temperatura 26°C, umidade relativa 90%		
Dias	N.° de Ixodidas	%
7	1	0.22
8	2	0.45
9	11	2.45
10	26	5.80
11	34	7.54
12	89	19.86
13	70	15.65
14	100	22.34
15	61	13.61
16	19	4.24
17	9	2.45
18	3	0.66
19	3	0.66
20	4	0.89
21	1	0.22
22	9	2.45
23	—	—
24	3	0.66
25	2	0.45
26	1	0.22
Total	448	

2a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

O período de tempo necessário à desova do *Amblyomma cajennense* pode ser maior quando as fêmeas são mantidas à temperatura do laboratório no mês de março. O quadro abaixo resume os resultados da experiência feita em um grupo de 100 Ixodidas, colhidos a 27-2-43:

Periodo próprio à desova (cotóquia) Temperatura do labortório (março 1943)		
Dias	N.º de Ixodidas	%
10	1	1.03
11	1	1.03
12	2	2.06
13	1	1.03
14	7	7.21
15	1	1.03
16	1	1.03
17	—	—
18	3	3.09
19	5	5.15
20	2	2.06
21	1	1.03
22	2	2.06
23	6	6.18
24	13	13.40
25	17	17.43
26	14	14.44
27	7	7.21
28	3	3.09
29	—	—
30	5	5.15
31	4	4.12
32	1	1.03
Total	97	

As médias das temperaturas observadas durante o mês de março de 1943 foram as seguintes:

Média temperaturas máximas 27.6°C
" " mínimas 16.0°C
Temperatura média 21.8°C
" máxima absoluta 30.4°C (dia 27)
" mínima " 11.3°C (dia 17)
Amplitude média 11.6°C.

Desta segunda experiência foram excluidos três exemplares, que morreram logo após a postura dos primeiros ovos. Êstes resultados se referem, pois, àquelas fêmeas, que deram uma desova satisfatória, isto é, pelo menos um volume de ovos correspondente à metade do máximo geralmente observado. É de interêsse assinalar que todas as fêmeas, que desovaram somente durante 10 a 15

dias (em número de 13), estavam mortas no último dia em que a desova foi verificada, tendo havido, assim, uma precoce interrupção da postura dos ovos devido à morte da fêmea. Todas as demais, cujo período de desova se prolongou além de 16 dias, morreram somente decorridos alguns dias após o último em que houve desova, como, aliás, se verifica normalmente.

Os ovos provenientes daquelas 13 fêmeas, cuja postura foi interrompida devido à morte, não evoluiram a contento, como veremos adiante, obtendo-se dêles somente uma ou outra larva, após decorrido o período prévio à eclosão. Ao contrário, todos os ovos oriundos das fêmeas cuja morte só foi verificada alguns dias após a desova final, evoluiram satisfatóriamente, obtendo-se da maioria dêles 100% de eciosões.

Sem que ainda possamos afirmar de maneira definitiva, parece-nos que lesões do capítulo das fêmeas comprometendo a glândula de Gené, acarretam a má lubrificação dos ovos, facilitando a posterior degeneração.

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS

Comparando-se os resultados das duas observações anteriormente citadas, vê-se que é possível apressar o período próprio à desova das fêmeas de *Amblyomma cajennense*, mantendo-as a uma temperatura mais elevada do que a do laboratório (Fig. 18).

A maioria dos Ixodidas mantidos na estufa a 26°C fez a postura dos ovos durante 7 a 19 dias (95%), ao passo que entre os que permanecem à temperatura ambiente do laboratório, 95% fizeram a desova do 7.° ao 30.° dia. Na primeira experiência, 13.7 dias representam a média ($\bar{X}_2$) do periodo próprio á desova, enquanto que na segunda $\bar{X}$ foi igual a 23.3 dias. Há, desta sorte, uma abreviação prática de 10 dias no prazo necessário à postura, mostrando as curvas de freqüência u'a melhor distribuição e uniformidade à temperatura constante do que à temperatura ambiente do laboratório. Esta curva até o 21.° dia foi bastante irregular, definindo-se somente após êste prazo. Êste fato fica bem evidenciado pela comparação das médias. À temperatura constante a média quase coincide com o máximo de freqüência, caraterística da curva normal de freqüência. À temperatura do laboratório, pelo contrário, a média distancia-se sensivelmente do máximo de freqüência, o que pode, sem dúvida, servir para confirmar o fato de, no primeiro caso, as condições biológicas terem sido realmente mais favoráveis. Em ambas as condições, o período correspondente às desovas mais rápidas foi sensivelmente igual, isto é, as causas determinantes sôbre a fêmea em desova agiram em períodos idênticos (morte da fêmea). Essa economia de alguns dias, somada à que pode ser feita nos demais períodos do ciclo evolutivo, traz vantagens apreciáveis, pois encurta o tempo de trabalho.

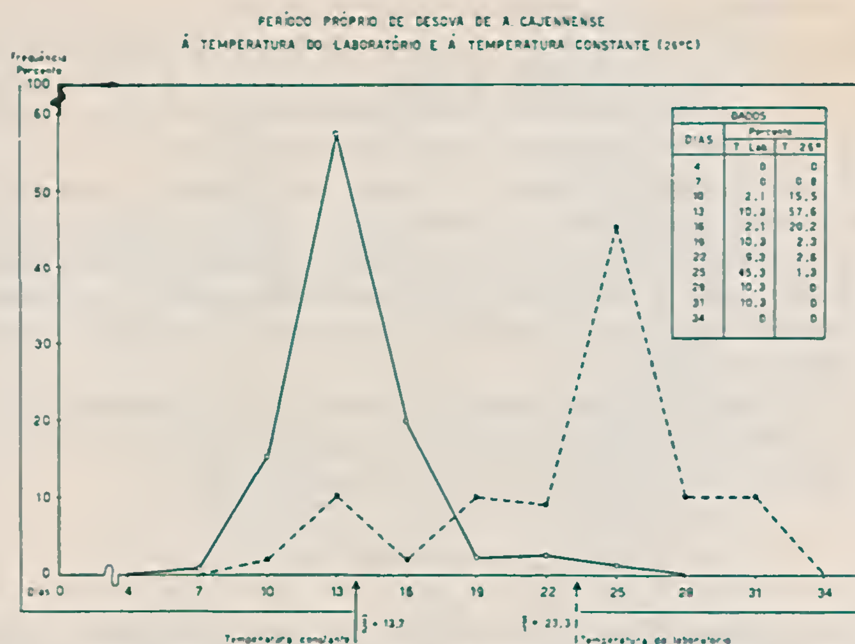


Fig. 18

CARATERÍSTICAS DOS OVOS DE *AMBLYOMMA CAJENNENSE*

O número de ovos de uma postura atinge alguns milhares e geralmente são tanto mais numerosos, quanto maior é o tamanho da fêmea. No quadro apresentando adiante damos os resultados de quatro posturas observadas cuidadosamente, podendo-se apreciar o número de ovos postos diariamente, avaliados por contagem direta. Tratando-se de experiência realizada em ambiente, cujas temperaturas foram mais regulares e inferiores às das experiências atrás citadas, a desova se processou durante maior número de dias, como é natural.

A desova máxima diária observada corresponde à fêmea No. 4, no seu 5.° dia, com um total de 1.237 ovos.

As desovas em geral foram contínuas para todas as fêmeas, com exceção da fêmea No. 3, que passou o seu 9.° dia sem desovar.

A morte das fêmeas deu-se algum tempo após terminada a postura: duas delas 4, uma 5 e a outra 8 dias depois do término da desova.

A fêmea de maior pêso (960 mg) deu uma postura de 9.830 ovos e a de menor pêso (750 mg), 5.773 ovos.

Os ovos de *Amblyomma cajennense* em boas condições para a evolução são de forma ovóide e coloração pardacenta brilhante. Quando apresentam côr tendente para castanho escuro, quase negro, perdem aos poucos o brilho caraterístico, tornam-se em pouco tempo menores e encarquilhados e não mais evo-

luem até larvas. Decorridos alguns dias após o início da postura, pode-se observar no interior dos ovos a presença de pequena mancha de côr branca, que, com o correr dos dias, aumenta de tamanho, tornando-se por fim bem visível, mesmo à vista desarmada. Esta mancha é um índice prático da boa evolução dos ovos e da proximidade do inicio da eclosão. Segundo alguns autores, ela é constituida de guanina, produto de excreção dos tubos de Malpighi, que as larvas posteriormente eliminam, salpicando de branco as paredes do tubo de contenção.

AMBLYOMMA CAJENNENSE

Estudo da desova e evolução dos ovos

Colheita das fêmeas em 12-11-43

Pêso em 12-11-43	960 mg	751 mg	767 mg	820 mg	Temperaturas	
Fêmeas Nos.	1	2	3	4	Máxima	Mínima
18—11	20 ovos	—	—	—	23	23
19—11	149 »	—	69	21	23	20
20—11	103 »	—	195	95	23	22
21—11	128 »	19	193	391	23	21
22—11	338 »	318	656	533	23	21
23—11	882 »	708	221	1237	22.5	21
24—11	714 »	482	185	353	19.0	18
25—11	643 »	253	604	292	20.0	18.0
26—11	458 »	220	501	360	21	20.3
27—11	412 »	158	0	479	19	16
28—11	105 »	301	420	415	20	16
29—11	885 »	362	552	495	20	17
30—11	741 »	48	786	413	20	18
1—12	494 »	461	610	410	21	18
2—12	672 »	301	494	316	22	20
3—12	344 »	213	344	225	21	19
4—12	318 »	41	179	185	20	19
5—12	228 »	219	252	243	21	19.5
6—12	359 »	266	290	289	22	20.0
7—12	248 »	176	249	236	22	21.0
8—12	201 »	159	209	142	22	21
9—12	283 »	213	275	245	24.5	21
10—12	210 »	164	218	178	25.0	23
11—12	111 »	120	123	114	25	23
12—12	115 »	162	146	84	25	24
13—12	85 »	179	118	167	26	24
14—12	29 »	42	79	45	26	25
15—12	4 »	114	54	41	25.5	24
16—12	0 »	51	26	24	25	24
17—12	0 »	3	21	33	25	23
18—12	0 »	0	0	10	22.5	20
19—12	0 »	0	0	0	21.0	19
20—12	0 »	0	0	0	20.0	20.0
21—12	0 »	+	0	0	20.0	19.5
22—12	+	—	+	+	20	18
Total ovos	9834 »	5753	8069	8071	22.2	20.38
Dias de desova	**28**	**27**	**29**	**30**		

3. Fase larval — 1.ª alimentação infetante

Eclosão dos ovos de *Amblyomma cajennense*

a) *Período prévio à eclosão.*

Terminada a desova, são necessários alguns dias para que os ovos sofram a eclosão e dêm origem às primeiras larvas ou neolarvas. A determinação dêsse período de tempo, que denominaremos período prévio à eclosão, foi feita em duas séries de observações realizadas com várias gerações de ovos de *Amblyomma cajennense.* A primeira, com ovos de Ixodidas mantidos à temperatura constante de 26ºC e umidade relativa de 90%, e a segunda com gerações de ovos que permaneceram à temperatura ambiente do laboratório.

O material utilizado constou de ovos das fêmeas usadas nas experiências anteriormente citadas, coletados diariamente num só tubo de contenção correspondente a cada fêmea. Os resultados serão, pois, relativos à evolução do conjunto de ovos da postura total de cada fêmea, isto é, de ovos depositados durante todo o período próprio à desova; não se referem, portanto, ao prazo real necessário à evolução dos ovos da postura de um mesmo dia. Levamos somente aqui em consideração os resultados do conjunto, devido à sua direta importância para os trabalhos da criação de Ixodidas destinados ao preparo da vacina.

1a. Experiência: Temperatura e umidade constantes.

Duzentas e vinte gerações de ovos mantidos à temperatura constante de 26ºC foram observadas na primeira experiência. O início da eclosão se processou entre fins de dezembro e 15 de janeiro. O quadro anexo resume os resultados.

2a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

Uma segunda experiência foi feita no corrente ano com 82 gerações de ovos provenientes da desova de fêmeas colhidas no mesmo dia, no mesmo local e mantidas em idênticas condições à temperatura ambiente do laboratório.

A desova começou nos primeiros dias de março, sendo o início da eclosão verificado entre fins de março e princípio de abril. Os resultados foram os seguintes:

Período prévio à eclosão				
Dias	(A) Temperatura 26°C	(B) Temperatura ambiente (março 1943)	(A) %	(B) %
	N.° de gerações de ovos	N.° de gerações de ovos		
13	3	—	1.36	—
14	1	—	0.45	—
15	6	—	2.77	—
16	5	—	2.27	—
17	9	1	4.09	1.21
18	18	1	8.18	1.21
19	34	1	15.45	1.21
20	26	3	11.81	3.65
21	41	3	18.63	9.78
22	25	8	11.36	13.41
23	9	11	4.09	10.97
27	4	9	1 81	12.19
25	5	10	2.27	8.53
26	6	7	2 77	6.09
27	—	5	—	6.09
28	2	5	0.99	6.09
29	4	5	1.81	4.87
30	—	4	—	4.87
31	—	4	—	1.21
32	1	1	0.45	2.43
33	8	2	3.68	1.21
34	2	1	0.99	—
35	1	—	0.45	—
36	9	—	4.09	1.21
37	1	1	0 45	—
Total	220	82		

As temperaturas registradas durante o período prévio à eclosão dos ovos utilizados nesta experiência foram as seguintes:

março — média temperatura máxima 27.6°C

temperatura máxima absoluta 28.4°C (em 27.3)

média temperatura mínima 16°C

temperatura mínima absoluta 11.2°C (em 17.3)

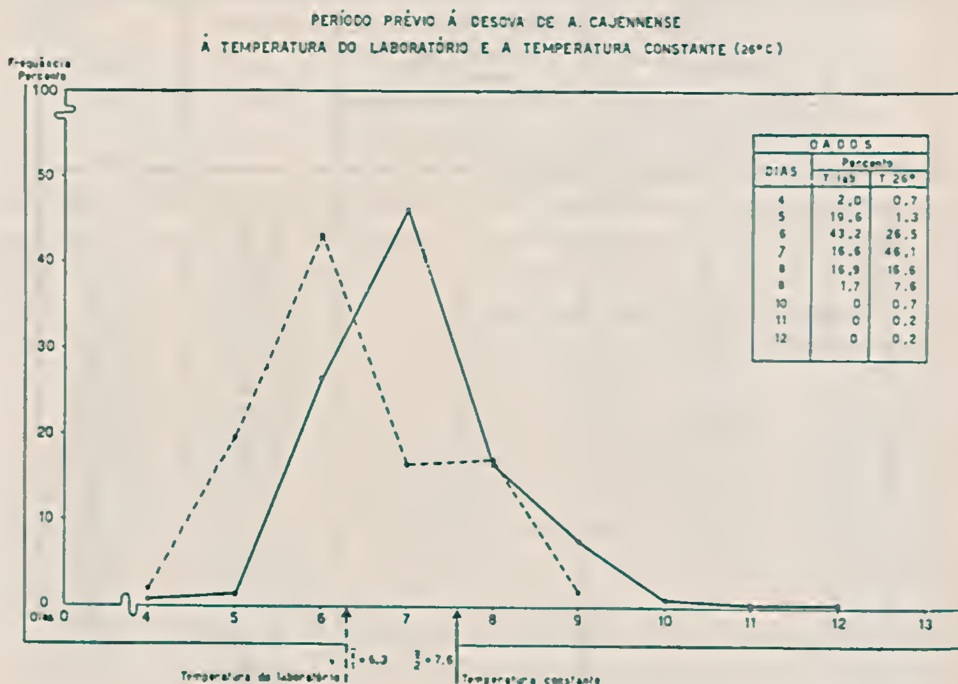
abril — média temperatura máxima 22.1°C

temperatura máxima absoluta 28.4°C (em 9.4)

média temperatura mínima 12.3°C

temperatura mínima absoluta 7.9°C (em 28.4)

O gráfico comparativo destas duas experiências mostra que a distribuição da freqüência em ambas as curvas é bastante regular.



DADOS		
DIAS	Percento	
	T lab	T 26°
4	2.0	0.7
5	19.6	1.3
6	43.2	26.5
7	16.6	46.1
8	16.9	16.6
9	1.7	7.6
10	0	0.7
11	0	0.2
12	0	0.2

FIG. 19

A curva que representa os resultados obtidos à temperatura constante é no seu conjunto mais normal do que a que representa os da temperatura ambiente do laboratório, mostrando, também neste caso, que o periodo prévio à eclosão à temperatura constante precede de 4 dias o da temperatura ambiente do laboratório nos meses em que a experiência foi feita. A média no primeiro caso foi de 21.7 dias (X_1) e no segundo 25.5 dias (X_2).

b) *Período próprio à eclosão.*

A eclosão observada em ovos da postura total de uma fêmea, isto é, de toda uma geração de ovos, quando mantidos à temperatura constante de 26°C e umidade relativa de 90% pode se prolongar durante 17 a 23 dias. Na experiência à temperatura ambiente do laboratório, realizada no decorrer dos meses de abril e maio de 1943, com as mesmas gerações de ovos utilizados na experiência anterior, verificou-se que o período próprio à desova foi consideravelmente menor do que naquela em que os ovos permaneceram à temperatura regular de 26°C.

Período próprio à eclosão dos ovos																		
Dias	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Total
(1) temperatura do laboratório	2	6	5	14	14	19	12	5	2	—								79
(2) temperatura a 26°C											1	1	23	108	72	14	1	220

(1) Observação com auxílio do microscópio entomológico
(2) Observação à vista desarmada

A disparidade observada nos resultados destas duas experiências é apenas aparente ou, então, pelo menos neste caso, os resultados não são comparáveis. Na segunda experiência, executada à temperatura de 26°C, para se julgar o momento correspondente à saída total das larvas, foi levada em conta a separação destas de seus detritos. Isto devido à mobilidade que apresentam as larvas a esta temperatura e à manifesta tendência que têm de subir pelas paredes do tubo de contenção logo após a eclosão, procurando alcançar a parte superior, onde então se agrupam. Verificamos, entretanto, que as larvas, mesmo alguns dias depois da eclosão dos ovos, continuam no fundo do tubo e só alguns dias depois se libertam, afastam os detritos e sobem a parede do tubo de contenção.

O início e o fim da eclosão só poderão ser bem observados com auxílio do microscópio entomológico. A côr dos detritos é apenas um índice prático, porém não exato, do fim das eclosões. Uma observação mais cuidadosa demonstra que a coloração amarelo clara, que apresentam os detritos livres das larvas, não é verificada imediatamente após a saída desta, mas, pelo contrário, só se torna evidente alguns dias depois da eclosão de todos os ovos. No lote de Ixodidas que permaneceu à temperatura ambiente, a observação foi realizada com o auxílio do microscópio entomológico, motivo pelo qual conseguimos surpreender na maioria das vêzes, a saída das primeiras larvas alguns dias mais cedo do que quando observámos à vista desarmada. Com o fim de facilitar ainda mais o exame e torná-lo mais rigoroso, espalhamos os ovos em placas de Petri nos últimos dias da eclosão, não só para verificar as últimas eclosões, como também para avaliar o rendimento ou percentagem de ovos evoluidos satisfatoriamente.

Desta forma, os dados máximos levados em conta na última experiência, sem dúvida mais exatos, diferem grandemente da experiência realizada no ano

anterior, cujos resultados evidentemente estão prejudicados. Uma nova experiência somente poderá ser feita no próximo ano, ao iniciarmos a criação e esclarecerá então melhor a influência da temperatura, tornando comparáveis os resultados das observações.

Percentagens de eclosões dos ovos de *Amblyomma cajennense*

A eclosão dos ovos, quando mantidos em boas condições, é quase sempre total. Contudo, podem ser verificadas posturas, nas quais só um reduzido número de ovos dão saída a larvas. Em geral, os ovos provenientes de fêmeas que morrem durante a postura, geram ovos que não evoluem satisfatoriamente. A mesma causa que acarreta a morte da fêmea deve ter influência sôbre a viabilidade dos ovos. Acreditamos que as lesões ocasionadas pela retirada defeituosa das fêmeas, quando ainda fixas aos animais, acarretem igualmente o comprometimento de certas glândulas que segregam substâncias impermeabilizadoras dos ovos, substâncias estas, que exercem uma função protetora contra a dessecação durante a evolução normal até a eclosão das larvas.

Quando a evolução dos ovos se faz satisfatoriamente, a eclosão se verifica em 100% dos ovos. Assim, por exemplo, em ovos provenientes de 79 fêmeas mantidas à temperatura do laboratório, obtivemos as seguintes percentagens de eclosões, avaliadas por observação cuidadosa ao microscópio entomológico:

67	gerações	de ovos	tiveram	eclosão	total (100%)			
2	"	"	"	"	de	95%	dos ovos	aproximadamente
3	"	"	"	"	"	90%	"	"
2	"	"	"	"	"	80%	"	"
2	"	"	"	"	"	70%	"	"
1	"	"	"	"	"	40%	"	"
2	"	"	"	"	"	30%	"	"
Total 79								

A eclosão total pode ser praticamente julgada pelo aspecto dos detritos das membranas ou envoltórios dos ovos, depositados no fundo do tubo, junto com a fêmea já morta. Quando todos os detritos têm côr amarelo-creme e não são encontrados resíduos de coloração marron claro, êste caraterístico pode servir de índice prático da eclosão de todos os ovos. As neolarvas se agrupam na maior parte na extremidade superior do tubo de contenção e, uma minoria, na periferia da extremidade inferior, no círculo de contato do tubo com a rolha de cortiça coberta pelo organdi, exatamente onde é maior a umidade.

As neolarvas provenientes de ovos de desovas incompletas não são aproveitáveis para a limentação infetante. Mesmo as oriundas de posturas medianamente volumosas, não devem ser aproveitadas, pois a prática nos tem largamente demonstrado o constante inaproveitamento final, geralmente ocasionado por uma alimentação sempre defeituosa por parte destas neolarvas, mesmo quando colocadas a se alimentarem em momento propício.

Considerações sôbre a evolução do *Amblyomma cajennense* até a fase de neolarva

Nas experiências anteriores, ao estudarmos a evolução da espécie *Amblyomma cajennense*, mostrámos as acentuadas variações do número de dias necessários à postura e eclosão dos ovos, verificadas entre diversas gerações de Ixodidas mantidos à temperatura do laboratório.

O total de dias decorridos entre a colheita das fêmeas alimentadas e o final da eclosão não foi, no entanto, muito variável. As variações mais pronunciadas verificadas nos resultados parciais corresponderam quase sempre aos exemplares que não evoluiram a contento ou mesmo não deram saída a larvas, de modo que não foram computados entre as gerações que fizeram evolução completa.

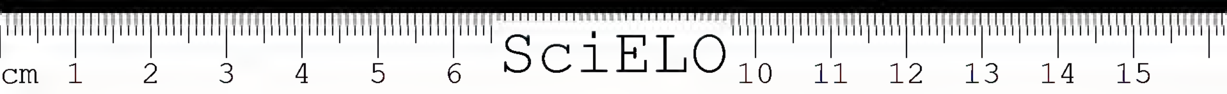
Entre as 79 gerações observadas, os dias requeridos para a completa evolução, desde a colheita das fêmeas até a saida de todas as larvas, variaram entre 64 e 80 dias; a grande maioria (91%) o fez entre o 67.° e 70.° dia. Colhidas as fêmeas a 27 de fevereiro, a eclosão dos ovos estava praticamente terminada entre os dias 5 e 8 de maio.

Total de dias decorridos da colheita das fêmeas até eclosão dos ovos.
Temperatura ambiente do laboratório (27-2-43 a 15-5-43)

No. de dias	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	Total
No. de geração	1	0	1	19	26	19	8	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	79
%	1.26		1.26	24.05	32.41	24.05	10.12	1.26		2.53			1.26				1.26	

Resumo esquemático da evolução até larva:

Si esquematizarmos, para uma orientação prática, a evolução do *Amblyomma cajennense* no período que vai da colheita das fêmeas cheias até a eclosão total dos ovos, levando em conta somente o dia em que maior percentagem de Ixodidas completou a evolução correspondente a cada período estudado, teremos os seguintes dados:



Esquematização da evolução até a fase de larva					
Fase	Postura		Eclosão		Total
	Período prévio	Período próprio	Período prévio	Período próprio	
Dias (Temperatura-laboratório)	7	25	23	12 (*)	67
Dias (Temperatura — 26°C)	7	14	21	20 (*)	63

(*) A comparação entre os resultados obtidos à temperatura do laboratório e à temperatura de 26°C só é possível entre os dados da postura e do período prévio à eclosão, porquanto pelas razões que explicamos atrás, não são comparáveis os números correspondentes ao período próprio à eclosão.

Rendimento

Todos os detalhes relativos à evolução dos Ixodidas que usamos nas experiências anteriores, podem ser analisados no quadro que inserimos no final dêste capítulo. Vemos, desta sorte, que das 100 fêmeas colhidas obtivemos somente 79 gerações de larvas em condições satisfatórias para se proceder à primeira alimentação infetante.

Na experiência feita entre Ixodidas que permaneceram sob a influência da temperatura e umidade sempre variáveis do ambiente do laboratório, as perdas foram assim distribuidas:

1. Até o período próprio à desova — 18 gerações de ovos
2. Até a eclosão — 3 gerações.

As 18 gerações de ovos inaproveitados eram provenientes da postura de fêmeas que morreram antes de concluida a desova.

Três exemplares morreram depois de um único dia de desova e os 15 outros quando já haviam desovado durante 10 a 15 dias.

Em quase todos os casos de posturas parciais, os ovos nunca evoluem de maneira satisfatória; não são tão brilhantes, nem de dimensões tão grandes quanto os ovos normais, em poucos dias escurecem, desidratam-se rápidamente, não dando mais saída a neolarvas.

Entre as gerações de ovos das fêmeas que desovaram satisfatoriamente, três não evoluiram a contento, tendo-se verificado a eclosão de apenas raros ovos (1 ou 2 dezenas no máximo). Correspondem êles às fêmeas: No. 33, cujo periodo próprio da desova foi de 23 dias; No. 43, com desova durante 25 dias, e No. 59, com o mesmo número de dias para o período de desova.

ESTUDO DO CICLO EVOLUTIVO DO *AMBLYOMMA CAJENNENSE* ATÉ A FASE DA LARVA

Observação de 100 gerações de ovos. Fêmeas colhidas a 27-2-43

Experiência à temperatura ambiente

Femea No.	Inicio da desova	Protoquia Desova Periodo prévio	Fim da desova	Coloquia Desova Periodo proprio	Inicio-eclosão	Eclosão Periodo previo	Fim da eclosão	Eclosão Periodo proprio	Percentagens de eclosões	Total de dias
1	5—3	6	1—4	27	23—4	22	6—5	13	100	68
2	7—3	8	28—3	21	24—4	27	5—5	11	100	67
3	6—3	7	20—3 +	14	—	—	—	—	—	—
4	6—3	6	5—4	30	28—4	23	8—5	10	95	69
5	7—3		1—4	25	26—4	25	5—5	9	100	67
6	6—3		30—3	24	25—4	26	7—5	12	100	69
7	7—3	8	1—4	25	26—4	25	7—5	11	100	69
8	6—3	6	30—3	24	26—4	27	6—5	10	100	67
9	8—3	9	20—3 +	12	—	—	—	—	—	—
10	6—3	7	31—3	25	24—4	24	6—5	12	100	68
11	9—3	10	19—3 +	10	—	—	—	—	—	—
12	4—3	5	30—3	26	23—4	24	5—5	12	100	67
13	6—3	7	20—3 +	14	—	—	—	—	—	—
14	7—3	8	(+)	—	—	—	—	—	—	—
15	6—3	7	25—3	19	25—4	31	5—5	10	100	67
16	5—3	6	5—4	31	23—4	18	5—5	12	100	67
17	6—3	7	30—3	24	26—4	27	9—5	13	90	71
18	5—3	6	1—4	27	24—4	23	7—5	13	100	69
19	8—3	9	1—4	24	23—4	22	5—5	12	100	67
20	6—3	7	31—3	25	23—4	23	5—5	12	100	67
21	5—3	6	1—4	27	23—4	22	7—5	14	100	69
22	4—3	5	26—3	22	22—4	27	5—5	13	100	67
23	7—3	8	31—3	23	3—5	33	15—5	12	95	76
24	6—3	7	31—3	25	28—4	28	8—5	10	100	70
25	8—3	9	19—3 +	11	—	—	—	—	—	—
26	5—3	6	1—4	27	23—4	22	5—5	12	100	67
27	6—3	7	(+)	—	—	—	—	—	—	—
28	6—3	7	19—3 +	13	—	—	—	—	—	—
29	6—3	7	5—4	30	25—4	20	7—5	12	100	69
30	5—3	6	31—3	26	29—4	29	11—5	12	100	73
31	5—3	6	24—3 +	19	—	—	—	—	—	—
32	4—3	5	5—4	32	22—4	17	6—5	14	100	68
33	8—3	9	31—3	23	28—4	28	(*)	—	—	—
34	8—3	9	1—4	24	4—5	34	17—5	13	90	80
35	5—3	6	5—4	31	25—4	20	5—5	10	100	67
36	8—3	9	5—4	28	27—4	22	6—5	9	100	68
37	6—3	7	1—4	26	22—4	21	6—5	14	100	68
38	6—3	7	26—3 +	20	—	—	—	—	—	—
39	6—3	7	31—3	25	28—4	28	8—5	10	100	70
40	6—3	7	31—3	25	25—4	25	5—5	10	100	67
41	5—3	6	4—4	30	27—4	23	7—5	10	100	69
42	5—3	6	24—3	19	25—4	32	6—5	11	100	68
43	5—3	6	30—3	25	29—4	29	(*)	—	—	—
44	8—3	9	1—4	24	24—4	23	6—5	12	100	68
45	8—3	9	5—4	28	29—4	24	7—5	8	100	69
46	5—3	6	1—4	27	24—4	23	5—5	11	100	67
47	5—3	6	19—3 +	14	—	—	—	—	—	—
48	6—3	7	5—4	30	25—4	20	8—5	13	100	70
49	7—3	8	1—4	25	25—4	24	7—5	12	100	69
50	6—3	7	1—4	26	26—4	25	6—5	10	100	68
51	8—3	9	31—3	23	23—4	23	6—5	13	100	68
52	6—3	7	20—3 +	14	—	—	—	—	—	—
53	8—3	9	1—4	24	26—4	25	7—5	11	100	69
54	6—3	7	20—3 +	14	—	—	—	—	—	—
55	5—3	6	5—4	31	26—4	21	6—5	10	100	68
56	8—3	9	1—4	24	24—4	23	6—5	12	100	68
57	6—3	7	31—3	25	26—4	26	6—5	10	100	68
58	6—3	7	31—3	25	24—4	24	6—5	12	100	68
59	5—3	6	30—3	25	29—4	30	(*)	—	—	—
60	6—3	7	30—3	24	25—4	26	6—5	11	100	68
61	8—3	9	23—3 +	15	—	—	—	—	—	—
62	6—3	7	31—3	25	22—4	22	5—5	13	100	67
63	6—3	7	24—3	18	26—4	33	8—5	12	100	70
64	6—3	7	1—4	26	25—4	24	6—5	11	100	68
65	6—3	7	26—3	20	2—5	37	11—5	9	30	73
66	6—3	7	20—3 +	14	—	—	—	—	—	—
67	4—3	5	31—3	27	21—4	21	5—5	14	100	67
68	8—3	9	31—3	23	26—4	26	7—5	11	100	69
69	5—3	6	4—4	30	23—4	19	6—5	13	100	68
70	6—3	7	1—4	26	26—4	25	6—5	10	100	68
71	8—3	9	20—3 +	12	—	—	—	—	—	—
72	6—3	7	1—4	26	29—4	28	7—5	8	100	69
73	6—3	7	20—3 +	14	—	—	—	—	—	—
74	5—3	6	24—3	19	23—4	30	8—5	15	100	70
75	5—3	6	(+)	—	—	—	—	—	—	—
76	6—3	7	30—3	24	25—4	26	6—5	11	100	68
77	6—3	7	1—4	26	28—4	27	7—5	9	100	69
78	6—3	7	1—4	26	30—4	29	8—5	8	100	70
79	6—3	7	1—4	26	23—4	22	5—5	12	100	67
80	8—3	9	1—4	24	30—4	29	7—5	7	80	69
81	6—3	7	31—3	25	23—4	23	6—5	13	100	68
82	5—3	6	23—3	18	22—4	30	5—5	13	100	67
83	5—3	6	31—3	26	22—4	22	5—5	13	100	67
84	5—3	6	31—3	26	25—4	25	6—5	11	100	68
85	6—3	7	31—3	25	28—4	28	6—5	8	100	68
86	5—3	6	23—3	18	23—4	31	4—5	11	100	66
87	6—3	7	1—4	26	25—4	24	6—5	11	100	68
88	5—3	6	1—4	27	26—4	25	6—5	10	100	68
89	5—3	6	30—3	25	25—4	26	6—5	11	100	68
90	8—3	9	5—4	28	28—4	23	6—5	8	100	68
91	7—3	8	23—3	16	23—4	31	5—5	12	70	67
92	5—3	6	5—4	31	30—4	25	8—5	8	30	70
93	4—3	5	30—3	25	23—4	24	3—5	10	100	64
94	4—3	5	23—3	19	22—4	30	7—5	15	100	69
95	6—3	7	31—3	24	26—4	26	7—5	11	100	68
96	8—3	9	1—4	23	26—4	25	8—5	12	80	69
97	5—3	6	1—4	26	25—4	24	7—5	12	100	68
98	8—3	9	1—4	23	30—4	29	8—5	9	70	70
99	8—3	9	31—3	22	1—5	31	8—5	7	40	69
100	7—3	8	1—4	24	24—4	23	8—5	14	90	69

NOTA: (+) Morte da femea antes do inicio da desova

\+ Interrupção da desova devido à morte da femea

(*) Eclosão de raros ovos; degeneração dos demais.


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

Rendimento da criação em larga escala até a fase de larva

Criação de 1938 — Na criação de *Amblyomma cajennense* iniciada em 1938 com a colheita de 1.000 fêmeas cheias, perderam-se durante o período aqui considerado 231 gerações, ou seja, 23.10% do total. Morreram antes de iniciar a postura 94 fêmeas (9.4%), possivelmente devido às lesões provocadas na ocasião da colheita; as demais 137 (13.70%) gerações de ovos não aproveitados eram provenientes de posturas médias ou mesmo totais, que não evoluiram satisfatoriamente até a fase de larva.

Criação de 1943 — Para os trabalhos de produção da vacina iniciamos a criação de Ixodidas com a colheita de 5.548 fêmeas de *Amblyomma cajennense*. Vejamos em resumo qual foi o rendimento até o período de eclosão entre exemplares mantidos até a fase de neolarvas à temperatura ambiente do laboratório.

1. fêmeas mortas antes de iniciar a postura	308 ou 5.55%
2. gerações de ovos nas quais as larvas obtidas não estavam em boas condições ou somente em número reduzido	497 ou 8.95%
Total de perdas até eclosões dos ovos	805 ou 14.50%

As restantes, ou sejam 4.743 gerações de ovos, deram praticamente eclosão total dos ovos, isto é, 100% de larvas aproveitáveis.

3. Fase larval — 1.ª alimentação infetante.

Alimentação das neolarvas

Caraterísticas das larvas de A. cajennense: *Escudo* — Comprimento 0.235, largura 0.336. Muito mais largo do que longo. Sulcos cervicais rasos, longos e mais ou menos paralelos. Superfície lisa, levemente chagrinada, sem pontuação. *Capítulo* — Comprimento 0.18, largura 0.15. Base curta e larga, com pontas arredondadas dos lados. Superfície lisa, sem pontuações. Palpos longos, com artículos 2 e 3 quase iguais, pêlos finos e em pequeno número. Comprimento total dos artículos II e III cêrca de 0.11. *Hipostômio* — Curto e alargado na ponta. Dentição 2/2. Comprimento cêrca de 0.086. (Cooley, R. A. & Kohls, G. M. (31)).

Período de espera

Processada a saída de todas as neolarvas, denominação que se dá às larvas não alimentadas, estas sobem pelas paredes do tubo de contenção e se amon-

toam próximo à abertura superior protegida pelo organdí. Decorridos alguns dias, só resta no fundo dos tubos detritos formados pelos envoltórios dos ovos. Após a eclosão, a côr dêsses detritos, que inicialmente é castanho pouco escuro, clareia aos poucos, apresentando a princípio coloração amarelo sujo e em pouco tempo se transforma em amarelo quase canário. Nessa ocasião, as neolarvas, que ao sair dos ovos são claras e relativamente transparentes, já se apresentam bem mais escuras, o que provavelmente decorre de u'a maior quitinização, não só das patas, como do próprio corpo do carrapato. A intensidade dessa quitinização pode servir de índice prático para julgar qual o momento propício à alimentação. Quando a quitinização é verificada em 100% das neolarvas, a mobilidade destas é sempre acentuada e, si colocadas a se alimentarem em coelhos, o fazem de maneira constante, colhendo-se ao fim de 8 dias elevada percentagem de larvas cheias; o contrário, quando ainda restam muitas larvas se quitinizarem, o rendimento em larvas cheias nunca é satisfatório.

O exame da intensidade de quitinização das patas das larvas deverá ser feito com auxílio de uma lente de aumento médio, não sendo para isso necessário tirar o tubo de contenção do interior do tubo protetor. Orientando-nos dêste modo, temos obtido o máximo aproveitamento dos animais usados para a alimentação das larvas.

Após repetidas experiências concluimos que o período de tempo que se deve deixar transcorrer entre o fim da eclosão e a alimentação das neolarvas, que permanecem à temperatura ambiente do laboratório durante os meses de maio e junho, deve ser no mínimo 32 dias. A escolha deve recair de preferência no 38.º ao 40.º dia, mesmo quando, devido à espera prolongada, uma pequena parte das neolarvas morra antes de chegado o momento de colocá-las nos coelhos. E' sempre preferivel agir assim, pois o rendimento obtido é sempre maior neste caso do que si colocarmos a se alimentarem larvas quando ainda não aptas a picar.

O período de espera pode ser prolongado satisfatoriamente, si as neolarvas forem mantidas à temperatura mais baixa (entre 14.º e 16.ºC), o que retarda a atividade metabólica do Ixodida, enquanto se aguarda a possibilidade de proceder à sua alimentação.

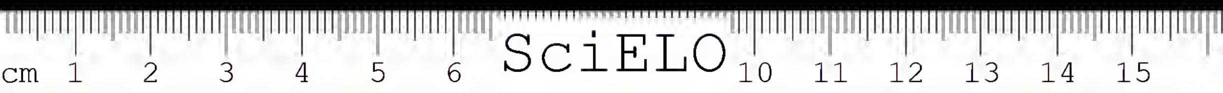
Para esta última exigência possuimos uma geladeira especial, regulada à temperatura conveniente, na qual pode permanecer grande número de caixas com vidros de proteção repletos de larvas, aguardando o momento da alimentação.

Técnica para alimentar as neolarvas

É com a alimentação das neolarvas que verdadeiramente se inicia a criação artificial dos Ixodidas. Esta fase é das mais delicadas, pois que de cada fêmea se obtêm em média 7.000 ovos e, portanto, 7.000 larvas. Em conseqüência da quantidade e da diminuta dimensão destas, foi necessário aperfeiçoar uma técnica que permitisse, não só bem aproveitar os animais que vão servir para alimentá-las, como também que fornecesse perfeita segurança durante o trabalho.

Preparo dos coelhos

Inoculação infetante. — Coelhos de pêso não inferior a 2.5 quilos são inoculados por via peritoneal com virus da febre maculosa. Para estas inoculações utilizam-se 2 a 5 cm^3 de sangue dos cobaios que servem para manter as diferentes amostras de virus no laboratório, por meio de passagens em série, feitas de cobaia a cobaia, por inoculação peritoneal. A sangria deverá ser feita durante a reação febril do animal, preferivelmente no 2.º ou 3.º dia de reação térmica, quando se deve verificar a esterilidade do sangue por semeadura em meios aeróbios e anaeróbios. Quatro a cinco dias após a inoculação, os coelhos podem ser preparados para o serviço de alimentação das larvas.



Colocação dos saquinhos protetores. — Verificada a predileção das larvas de *Amblyomma cajennense* a se fixarem na orelha dos coelhos, onde se alimentam melhor e mais facilmente, resolvemos aproveitar esta circunstância para obter um alto rendimento. Com esta finalidade preparamos uma espécie de cartucho ou cilindro de organdi de dimensões que permitam conter com certa folga as orelhas dos coelhos (*). Êstes cilindros ou cartuchos, após introduzida a orelha no seu interior, são fixados na cabeça do coelho, em tôrno da base da orelha por meio de esparadrapo. Com o fim de facilitar a adesão do esparadrapo, retiram-se os pêlos em tôrno da inserção do pavilhão auricular por meio de máquina de cortar cabelo, navalha ou mesmo usando qualquer depilatório (a). A fixação do cilindro de organdi na base das orelhas do coelho deverá ser feita de modo a não dificultar a circulação sangüínea. Uma tira de esparadrapo de 1.5 cm de largura deve prender inicialmente na cabeça e de forma circular subir até atingir a base do cilindro, de modo que uma volta do esparadrapo se venha sobrepor à metade superior da volta anterior, fechando-a por fim na base (b).

Fixação no interior das mesas de manipulação. — Colocados os saquinhos protetores, os coelhos são levados às mesas (**) de manipulação de Ixodidas (c), onde podem ser fixados em bandejas apropriadas, cuja parte mediana tem uma escavação em forma de meio cilindro longitudinal, servindo para contê-los e imobilizá-los por meio de fixadores armados de faixas de pano. Êstes fixadores podem mover-se longitudinalmente, deslisando sôbre frisos dispostos paralelamente ao longo do meio cilindro escavado (d).

Uma toalha branca, tendo no seu terço anterior um corte suficientemente grande para permitir a passagem das orelhas do coelho, cobre todo o animal e evita que durante a manobra de colocação das neolarvas, estas possam vir a espalhar-se nos pêlos do coelho, acautelando-nos, assim, contra a possível dispersão de Ixodidas (e, f).

Colocação das neolarvas. — Cada coelho adulto, de pêso não inferior a 2.5 quilos, pode servir para a alimentação infestante de larvas resultantes da desova de quatro fêmeas; em cada orelha são colocadas em média 14.000 neolarvas, isto é, o produto de duas gerações de ovos de *Amblyomma cajennense*.

Coelhos de pêso inferior, que geralmente não resistem à infecção, não suportam tão grande número de neolarvas.

Imobilização das neolarvas. — Os tubos de contenção cheios de neolarvas são retirados do interior dos tubos de proteção e depositados na mesa de trabalho depois de permanecerem alguns minutos na geladeira. É natural que a temperatura ambiente do laboratório, principalmente nos dias de verão, a mobilidade das neolarvas seja bastante grande, o que dificulta o trabalho de colocá-las nas orelhas dos coelhos. Pela ação do frio ficam imobilizadas, simplificando o manuseio.

(*) Ressaltamos aqui a importância da escolha do tecido usado no preparo dêstes saquinhos ou cartuchos. É indispensável que as malhas do tecido não permitam a passagem das larvas, e não sejam também demasiado apertadas, de modo a dificultar a aeração.

(**) Adiante descreveremos as mesas de manipulação de Ixodidas.



FIG. 20



Fig. 20

Distribuição. — A colocação dos Ixodidas na parte interna do pavilhão auricular, envolto pelo saquinho protetor de organdi, é facilitada pelo uso de um funil de vidro ou mesmo um cartucho de papel; as neolarvas, primeiramente depositadas no receptáculo do funil, são, com o auxilio de uma espátula fina, manejada com precaução, levadas para o interior do pavilhão auditivo do coelho (g).

Terminada esta manobra, a abertura superior do saco protetor de organdi é fechada, dobrando-se a extremidade duas vêzes e obturando-a com esparadrapo (h). As neolarvas, que acidentalmente tenham caido na toalha, são facilmente visiveis e podem ser retiradas por meio do tubo coletor de carrapatos, ligado ao aparelho de vácuo facilmente manuseado pelo auxiliar (i). (Por ocasião da descrição dos detalhes técnicos acêrca da colheita de larvas cheias descreveremos o tubo ou aparelho de coleta). Esta última manobra é quase sempre desnecessária quando se usam Ixodidas previamente imobilizados pela permanência durante alguns minutos à baixa temperatura.

Retirado o pano que cobre o coelho, êste pode ser desamarrado e manuseado sem perigo, fóra da mesa de proteção (j).

Proteção das orelhas dos coelhos. — Os saquinhos contendo as larvas são protegidos contra as tentativas feitas pelo coelho para retirá-los, por meio de um aparelho de couro, que permite o fácil arejamento através de duas fendas laterais (k). As fendas laterais são igualmente protegidas por meio de tela de arame fino.

O aparelho protetor é constituido de um cilindro de couro, medindo 12 cm de altura por 1 cm de diâmetro que permite conter as duas orelhas. A parte inferior do cilindro é fixada a uma faixa circular, também de couro, destinada a bem se adaptar à cabeça do animal, servindo de apôio às duas correias que a fixam abaixo do pescoço por meio de uma fivela que as ajusta perfeitamente. Desta mesma faixa circular parte posteriormente uma fita, também de couro, tendo na porção terminal um cinta com fivela para prender o aparelho ao corpo do coelho, atrás dos membros anteriores (k). Na parte superior mediana da fita acima referida, existe um botão de pressão, cujo negativo está colocado no cilindro de couro, de modo a poder fixá-lo no seu terço superior, dando ao mesmo tempo uma inclinação conveniente à perfeita posição das orelhas, sem prejudicar a circulação sanguinea.

Permanência no biotério. — Os coelhos, com as orelhas assim protegidas, são levados para os compartimentos isolados do biotério, onde permanecem durante todo o periodo da alimentação infetante das larvas (l). Deverão êles ser revistos duas vêzes por dia pelo menos, para controlar a perfeita adaptação dos aparelhos de proteção e tomar as medidas aconselhadas no caso de saida de Ixodidas.

Pelas nossas observações podemos afirmar que, bem conduzida esta técnica, são raras as vêzes em que as larvas são encontradas fóra das orelhas, no corpo do coelho ou nas paredes do biotério e mesmo assim, quando isto acontece, é somente com metalarvas, isto é, larvas já alimentadas, apresentando, por conseguinte, pouco perigo para o serviço. São mais facilmente visiveis e pouco móveis, além do que, estando já bem alimentadas, não têm mais tendência a picar.

Biotérios

A riquétsia, agente etiológico da febre maculosa é incultivável nos meios artificiais de cultura: sua reprodução só é possível em presença de tecido vivo e se processa no interior das células vivas. O meio mais fácil usado nos trabalhos experimentais para manter e reproduzir êste material virulento, ainda é a inoculação seriada feita em animais sensiveis. Desta sorte, torna-se indispensável, quer para os trabalhos de rotina, quer para os de investigação, usar um grande número de animais (cobaias, coelhos), mantidos em rigorosas condições e procurar dentro do possivel afastar as causas de erro que possam influir no julgamento das reações apresentadas. Nas experiências ou mesmo nas inoculações rotineiras dos trabalhos de febre maculosa, os animais de prova têm de ser mantidos no interior dos laboratórios, sob contrôle imediato dos técnicos e sem qualquer contato com o exterior. Devido a êste fato, tornou-se indispensável construir biotérios apropriados, que permitissem a manutenção, em condições satisfatórias, dos animais durante o periodo de observação, obedecendo a requisitos práticos:

a) comportar grande número de animais no menor espaço possível;

b) possuir compartimentos separados, de modo a isolá-los.

c) contar com proteção eficiente contra possíveis acidentes devidos a defeitos nos aparelhos usados para manter os Ixodidas colocados aos animais;

d) permitir fácil limpeza.

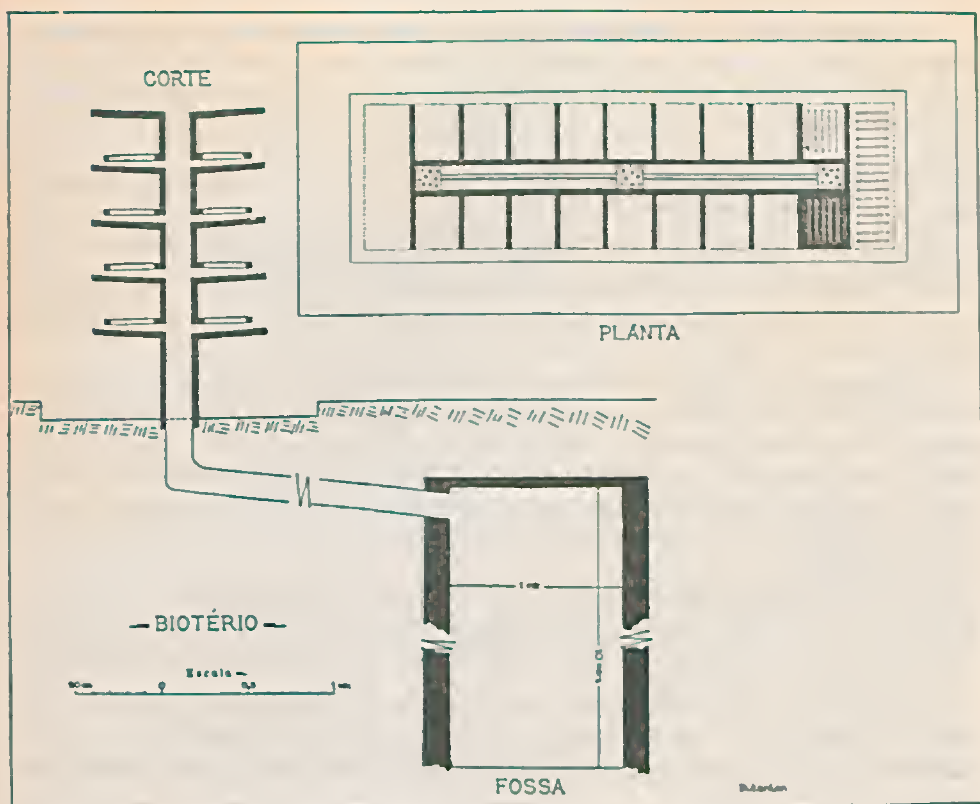
Em obediência a êstes princípios básicos, idealisamos e fizemos construir biotérios, que, a nosso ver, preenchem perfeitamente as exigências requeridas nos trabalhos desta natureza.

Foram construidos no interior do laboratório três biotérios de concreto armado: dois para pequenos animais e um para animais de maior porte.

Descreveremos apenas os biotérios destinados aos animais de pequeno porte (coelhos e cobaias). O biotério para animais maiores é do mesmo tipo e obedece ás mesmas carateristicas, variando apenas no número e nas dimensões dos compartimentos.

Descrição dos biotérios

Os biotérios para coelhos e cobaias constam de um conjunto de gaiolas dispostas em 4 fileiras e apoiadas em uma coluna retangular central, cujo interior ôco, ligado aos condutos de esgotos, serve para a passagem dos detritos (dejetos, restos de alimentos ou, acidentalmente, carrapatos), que são assim levados para a fossa asséptica, situada fora do edifício.



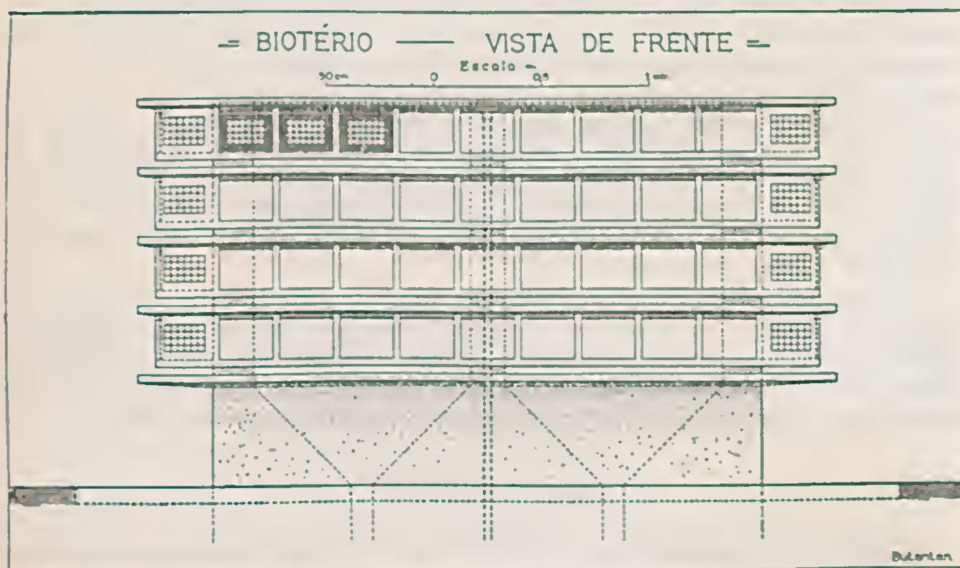


FIG. 21-a
Planta do biotério para pequenos animais.

Na parte mais alta da coluna central, há um conduto perfurado em todo o seu comprimento, colocado no sentido ântero-posterior do biotério, por meio do qual se pode fazer jorrar, dentro da coluna, um jacto de água quente ou fria para facilitar a limpeza interna, evitar que detritos fiquem aderentes às paredes da coluna, arrastando-os até a fossa asséptica.

A primeira série de gaiolas fica a 70 cm acima do assoalho; as demais são espaçadas umas das outras aproximadamente 35 cm.

Em ambos os lados do biotério, cada fileira tem nove pequenas gaiolas com as seguintes dimensões: 27 cm de frente, 21 cm de altura e 35 cm de profundidade.

Nas extremidades há ainda em cada andar ou série de gaiolas um grande compartimento, que toma toda a largura do biotério e que mede 90 cm de frente, 35 cm de lado e 21 cm de altura.

Os compartimentos laterais têm espaço suficiente para conter 4 cobaias ou um coelho de grande porte. São destinados especialmente aos cobaios e coelhos inoculados para alimentação infetante dos carrapatos. Propositalmente, não foram construidos mais espaçosos, afim de, até certo ponto, restringir aos coelhos a liberdade de fazerem movimentos mais amplos, quando são levados a se coçarem em conseqüência do prurido provocado pela picada dos Ixodidas, o que poderia provocar o desprendimento ou mesmo a ruptura dos aparelhos de proteção.

As gaiolas são separadas umas das outras por meio de um caixilho de concreto armado, cujo centro telado permite ampla ventilação entre os diversos compartimentos. A frente é fechada por uma grade de ferro, facilmente removível e que pode ser bem ajustada por um dispositivo de segurança.

O assoalho de cada compartimento, escavado em estrias longitudinais, permite a fácil limpeza das gaiolas, assim como a queda das dejeções ao piso, que constitui o teto do compartimento que lhe fica abaixo. Por meio de um simples jacto dágua, quente ou fria, processa-se facilmente a limpeza.

Todo conjunto do biotério está, na sua parte inferior, isolado do assoalho do laboratório por meio de uma bacia, que ultrapassa em 25 cm a projeção vertical dos bordos mais salientes das fileiras de gaiolas. A função desta bacia, que tem a altura de 10 cm e que contém solução carrapaticida, é impedir aos Ixodidas acidentalmente livres, ir além dos limites do biotério.

Lateralmente, os biotérios podem ainda ser protegidos por uma cortina, que, presa a argolas, pode correr em uma haste metálica fixa, em cima, no alto da fileira superior de gaiolas e, abaixo, no assoalho da última, atingindo, assim, todas as séries de gaiolas. É esta uma medida complementar de proteção. Evita sejam projetados Ixodidas, devido aos violentos movimentos dos coelhos, além dos limites do biotério, ultrapassando a barreira de carrapaticida constituida pela bacia.

As observações feitas durante os trabalhos de rotina nestes últimos anos, permitem concluir pela eficiência dêstes biotérios. De grande capacidade, ocupando pouco espaço, permitem realizar todo o trabalho de manutenção seriada das várias amostras de virus já identificadas ou em estudo, assim como a alimentação dos carrapatos, mantendo-se os animais de experiência durante todo o período de observação em condições satisfatórias.

Uso dos biotérios

Quando há necessidade de isolar cada animal, êles podem ser colocados em compartimentos separados ou mesmo em andares diferentes.

Todo animal inoculado com qualquer material de passagem para manutenção de virus ou de experiência recebe um número, que é gravado numa chapa metálica, adaptável ás orelhas. A êste número corresponde uma ficha, na qual constam todos os detalhes do animal fornecido pela Seção de criação, além de dados relativos ao material inoculado. Nesta ficha, a curva térmica é acompanhada diariamente e, após a morte ou sacrifício do animal, anotam-se os achados na necrópsia com a sua eventual interpretação.

O encarregado do biotério registra em um livro o "andar" e a divisão onde colocará o animal ou os animais já numerados. Esta indicação é dada do seguinte modo:

Cob. 2850 — 1 A 4

o que significa: Cobaia No. 2850, biotério No. 1, andar A, gaiola 4.

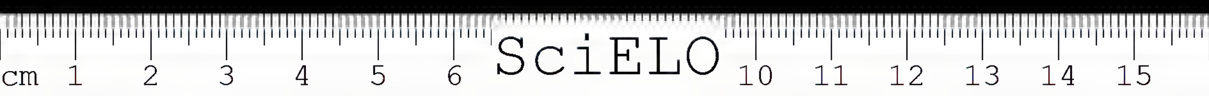
O lado esquerdo de cada conjunto de gaiolas tem numerações iguais ás do lado direito, de modo que a mudança diária para o compartimento limpo é feita para a mesma gaiola A 4 do lado oposto. O animal permanece até a morte ou término da observação no mesmo compartimento A 4 de um ou de outro lado do biotério. Isto permite encontrar rapidamente o animal procurado.

Os animais em observação são trocados diariamente de compartimento, de modo a facilitar a limpeza e perfeita secagem de cada compartimento do biotério após a lavagem que se faz pela manhã. Isto não pode, nem é aconselhável se fazer com os animais que estão servindo á alimentação dos Ixodidas; êstes permanecem na mesma divisão até que os carrapatos sejam retirados.

No nosso serviço dispuzemos de um dos biotérios exclusivamente para animais que servem para alimentar os Ixodidas e o outro somente para os usados na manutenção das amostras de virus ou para animais em experiência. Neste último caso usamos a ala direita do biotério nos dias pares e a esquerda nos dias ímpares, de modo que pela manhã de cada dia os animais vão para um compartimento limpo, praticamente esterilizado com água quente e absolutamente sêco.

O encarregado do biotério, além da limpeza e da alimentação dos animais, deverá tirar diariamente, a partir de 8 horas da manhã e após 2 horas da tarde, as temperaturas de todos os animais, no que é auxiliado por outros funcionários, que nessa ocasião verificarão qualquer anomalia notada, como, por exemplo, presença de reações escrotais, escaras cutâneas, etc.

Após a tomada das temperaturas, são elas, juntamente com os outros dados, registrados em livro de registro e nas fichas individuais até o momento em que um dos assistentes da Seção, verificando o movimento geral, controlará as experiências e eventualmente mandará repetir a tomada das temperaturas, determinará os animais a sacrificar, suspenderá a observação de alguns, verificará as lesões evidenciadas na necrópsia ou fará passagens de virus.



Sala dos biotérios

A sala em que estão dispostos os diversos conjuntos de gaiolas tem dois exaustores, que esgotam o excesso de umidade e arejam o ambiente. Isto é principalmente necessário nos dias quentes de verão, em conseqüência da grande superfície de evaporação das bacias e do grande número de animais alí contidos.

As paredes e o teto da sala de biotérios deverão ser preferivelmente ladrilhados ou pintados a óleo, de modo não só a facilitar a limpeza diária, como evitar o crescimento de cogumelos em conseqüência da umidade alí mantida.

Nas experiências que requerem observações durante longos períodos de tempo, tanto as cobaias como os coelhos se ressentem da permanência muito prolongada no biotério; nesse caso precisamos intervir e reforçar a alimentação, juntando à ração diária alimentos frescos, óleo de fígado de peixe contendo vitaminas A e D.

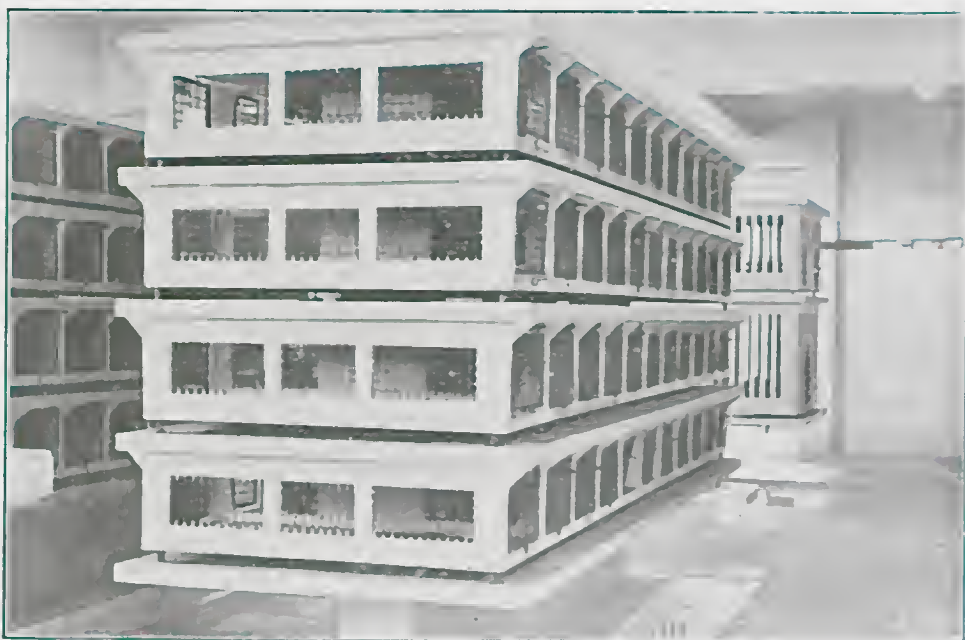


Fig. 22
Biotérios.

É de toda conveniência que o local onde se encontram os biotérios para observações dos animais durante longo período, fiquem situados de modo a permitir o isolamento, pelo menos durante algumas horas do dia, protegendo-se o recinto por meio de paredes envidraçadas.

A sala de contrôle geral está ao lado da sala dos biotérios e isolada desta por divisões de vidro.

Todo o alimento dos animais é trazido ao interior do laboratório por meio de uma caixa metálica, que da sala dos biotérios se comunica com o exterior.

Os animais sacrificados são logo após a necrópsia conduzidos a um forno crematório, cuja porta se comunica com o interior da sala de biotérios. Um botão elétrico aciona um massarico alimentado a óleo, que, funcionando alguns minutos, reduz a cinzas os animais alí colocados. A limpeza do forno para a retirada dos resíduos é feita por uma outra porta, que está ligada ao lado externo do pavilhão.

Mesa de proteção para trabalhos com Ixodidas

Esta mesa de proteção destina-se aos trabalhos de manipulação com Ixodidas infetados e foi especialmente construida para evitar o contato direto do técnico com o material infetante. Está localizada na própria sala dos biotérios. Compõe-se essencialmente de uma grande bacia de concreto armado, sustentada por uma coluna central, no interior da qual passam encanamentos para água quente e fria, esgotos, vácuo, gás, ar comprimido e corrente elétrica, necessários aos trabalhos. Na parte superior, a bacia tem a forma de um retângulo e mede 2 metros de comprimento por 80 cm de largura; destina-se a conter 2 bandejas, que se encaixam em suportes fixados na parte inferior por meio de fortes hastes metálicas. Com êste dispositivo as duas bandejas removíveis ficam perfeitamente isoladas do retângulo, que constitui as margens da bacia. Esta é cheia com uma solução concentrada de líquido carrapaticida para impedir a passagem de quaisquer carrapatos da bacia para a mesa propriamente dita.

O retângulo tem em todo o seu contôrno uma margem superior horizontal de 25 cm; na extremidade é ela bem maior, servindo de mesa auxiliar para depositar o material que deverá ser introduzido na câmara.

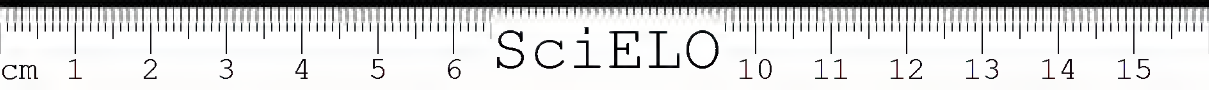
Uma armação de madeira, de forma retangular é encaixada no concreto da bacia. Esta armação tem aproximadamente 20 cm de altura no sentido vertical e desde êsse ponto vai, por meio de caixilhos de vidro, ligar-se a um outro retângulo bem menor, situado na parte central e 40 cm mais alto.

Nêste segundo retângulo, há um exaustor, que permite retirar todo o vapor de água acumulado no interior da mesa de proteção e que se deposita na parte interna dos vidros, dificultando a visão. A abertura onde funciona o exaustor deverá ser protegida por uma tela de malhas bem finas à prova de carrapatos.

Na parte lateral da base retangular de madeira há aberturas que permitem adaptar em armações especiais de metal, luvas brancas de cano longo.

O esquema que juntamos mostra os detalhes de construção da mesa, podendo-se observar todos os dispositivos internos que facilitam o trabalho com carrapatos, trabalho êste, que poderá ser feito por dois grupos de dois homens, um técnico e um auxiliar, no mesmo momento, destinando-se uma das bandejas para cada grupo, ficando o auxiliar sempre na frente do técnico.

O material usado no serviço, como sejam: tubos de contenção, tubos de proteção, esparadrapo, gaze, aparelhos para os coelhos, etc., bem como os animais já previamente inoculados, é introduzido na mesa pelas aberturas terminais ou mesmo pelas laterais. O fe-



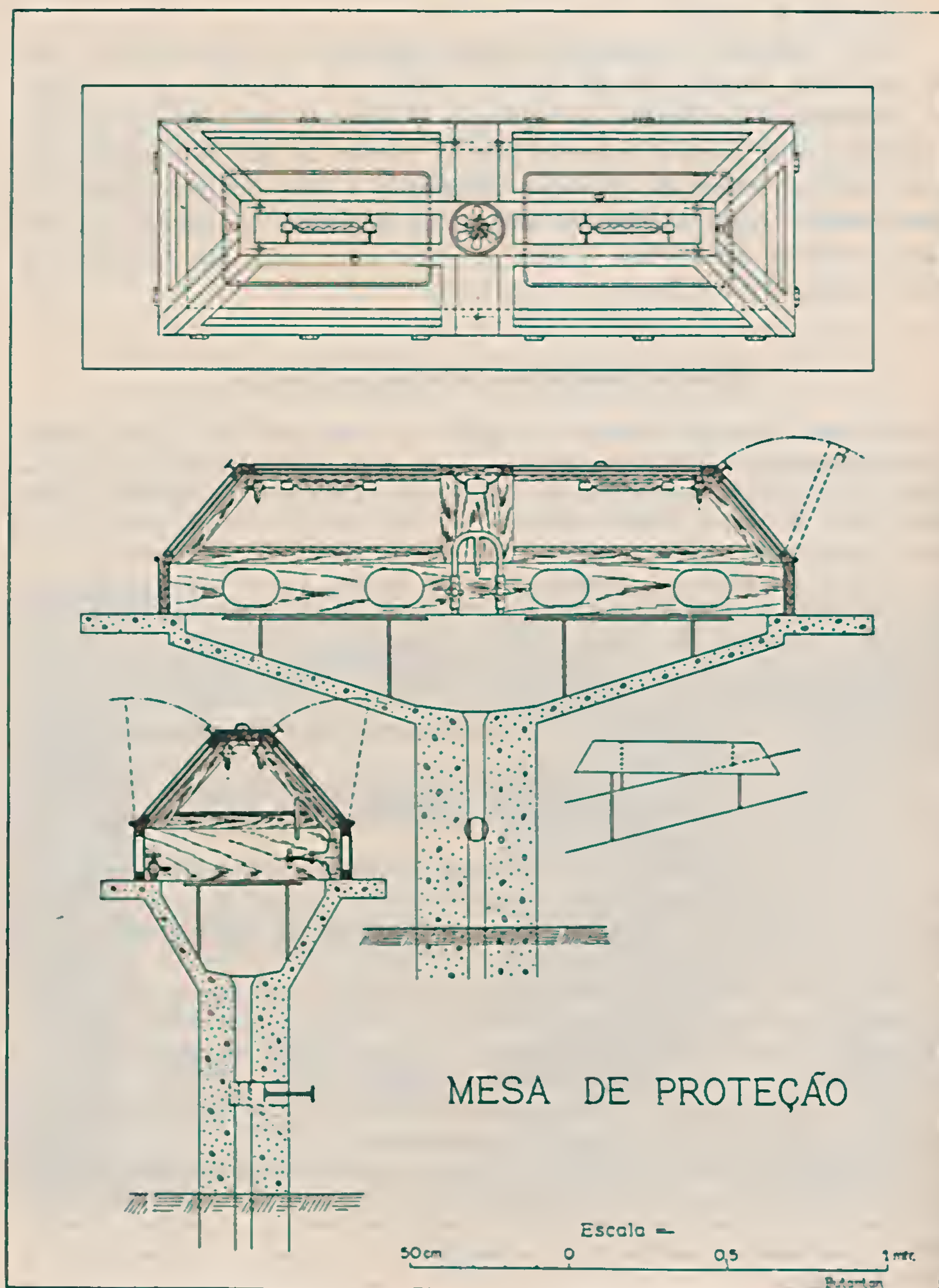


Fig. 23
Esquema da mesa de proteção.

chamento da mesa de trabalho se faz de maneira perfeita, ajustando as aberturas ou janelas por meio de borboletas de pressão.

Terminados os trabalhos diários, o interior da mesa é lavado ou com água quente ligada à torneira existente no interior ou com solução de carrapaticida.

Tubo de colheita de carrapatos

O tubo de colheita destina-se a facilitar a coleta de Ixodidas nas fases de larva e ninfa, quer antes, quer depois da alimentação.

O aparelho ou tubo de colheita de Ixodidas consta de um tubo cilíndrico de vidro com diâmetro igual ao dos tubos de contenção, anteriormente descrito. Êste tubo é estirado em uma das suas extremidades, tendo no conjunto um comprimento total de 15 cm. A parte estirada serve para ser conectada à torneira de vácuo por meio de um tubo de borracha. Na outra extremidade adapta-se um tubo de contenção, de modo que a parte protegida pelo organdi (parte fechada) fique em contato com a abertura maior do tubo de coleta. A fixação do tubo de contenção ao de coleta faz-se por meio de uma fita de es-

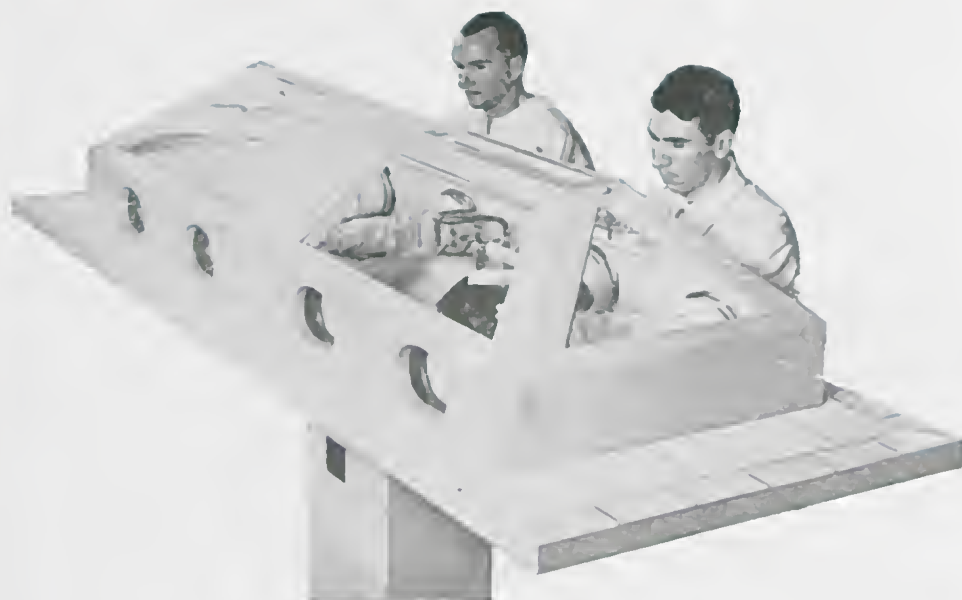


Fig. 24
Mesa de proteção.

paradrapo. Na parte aberta do tubo de contenção já fixado ao aparelho — que normalmente é fechada com a rolha de cortiça — coloca-se uma rolha de borracha perfurada e atravessada por um tubo de vidro ligeiramente estreitado na sua extremidade distal e com abertura suficiente para deixar passar com facilidade uma larva bem cheia.

Um tubo com esta abertura servirá para coletar neolarvas ou metalarvas, bem como neoninfas. No caso de metaninfas ou ninfas já alimentadas usa-se um tubo de abertura maior, que pode servir também para manipular adultos não alimentados.

Abrindo-se a torneira de vácuo, o aparelho de coleta está pronto para ser utilizado. Aproxima-se a parte aberta do tubo aos Ixodidas, que são então aspirados para o interior do tubo de contenção, onde ficam retidos pela proteção da tela de organdi.

Quando os tubos estão suficientemente cheios (em média 150 larvas cheias) e desligado o vácuo, retira-se a rolha de borracha do aparelho, substituindo-a novamente pela de cortiça. Destacando-se o esparadrapo, os tubos de contenção cheios de Ixodidas estão prontos para serem acondicionados nos tubos de proteção, numerados e colocados nas caixas que permanecem nos armários à temperatura ambiente do laboratório ou nas estufas até se verificar a ecdise.

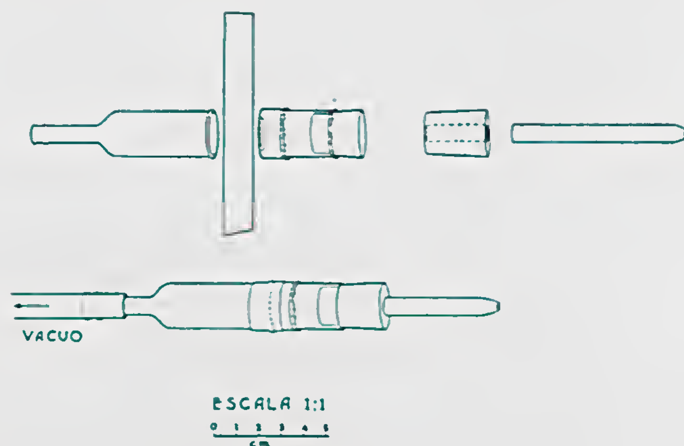


FIG. 25
Tubo de coleta de carrapatos.

O vácuo utilizado para a manobra da colheita dos Ixodidas deverá ser ajustado, de modo a facilitar a entrada de larvas ou de ninfas, vazias ou cheias, no tubo de contenção, sem provocar correntes violentas, que podem lesar os Ixodidas, ocasionando perdas na criação, perdas estas que são, via de regra, tanto maiores, quanto maior for o tamanho do carrapato. Na fase ninfal, por exemplo, a ausência destas precauções pode ser altamente prejudicial, acarretando a morte de grande parte dos exemplares, principalmente quando se trabalha com metaninfas ou ninfas já alimentadas.

Alimentação e colheita das larvas alimentadas

Os coelhos, nos quais foram colocadas as larvas, permanecem nos compartimentos isolados do biotério durante vários dias, geralmente 8 a 10. Na realidade, a alimentação de uma larva, isoladamente, do momento da fixação ao hospedeiro à queda espontânea, não demora tanto tempo, podendo ser feita de maneira completa em 3 a 4 dias. A desigualdade do momento de fixação das larvas se explica pela idade variável das neolarvas. A desova das fêmeas faz-se por período de tempo que se prolonga por vezes até 26 dias, tendo as neolarvas resultantes também idades variáveis. Quando, portanto, colocamos uma mesma geração de larvas a se alimentar, teremos variações muito grandes quan-

to ao momento propício à picada. Não convem dilatar o prazo de 8 a 10 dias, porque a alimentação das larvas só é util na fase de circulação sangüínea do virus; essa fase coincide com aquêle espaço de tempo.

Tendo-se em conta as precauções acima citadas, obtêm-se após êsse prazo: larvas totalmente alimentadas e já destacadas do hospedeiro, larvas em alimentação, ainda fixadas, e larvas não alimentadas e não fixadas. Estas, contudo, nem sempre são em larga percentagem, o que torna o processo útil para fins práticos.

Quando os coelhos são de pequeno porte ou a quantidade de larvas muito elevada, pode acontecer que aquêles venham a morrer antes de decorridos os dias necessários à alimentação das larvas. Neste caso, aquelas que forem encontradas cheias serão imediatamente retiradas e aproveitadas. Quando o coelho permanece vivo, a colheita é feita após sacrifício do animal por meio de

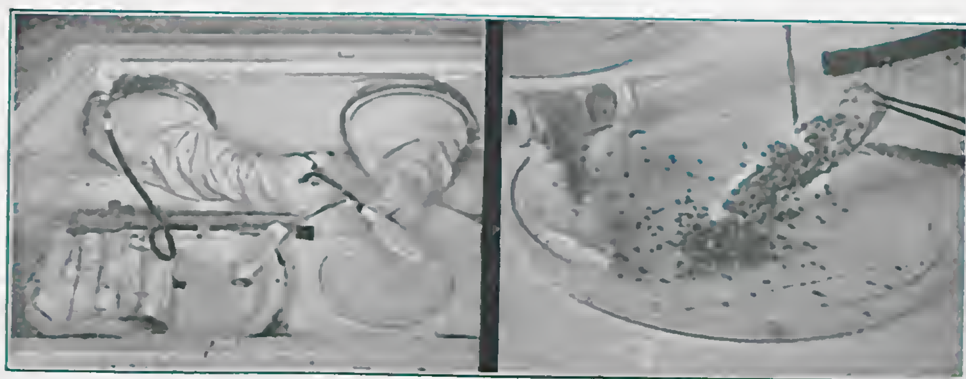


Fig. 26
Abertura dos saquinhos contendo as orelhas de coelhos repletas de ixodidas já alimentados.

pancada na cabeça. As orelhas, protegidas pelos saquinhos, são em seguida cortadas na base com tesouras abaixo do ponto de fixação do saquinho de organdí, depois de retirado o aparelho protetor de couro. As orelhas, ainda envoltas pelo saquinho de organdí, são colocadas em bandejas numeradas que são conduzidas à mesa de proteção. Os coelhos são imediatamente levados ao forno crematório.

Os saquinhos são abertos um a um com tesoura sôbre folhas circulares de papel branco ou sôbre grandes cristalizadores. As larvas cheias estão quase sempre soltas, enquanto que aquelas ainda fixadas são retiradas, cuidadosamente, por meio de pequena espátula. Feita esta coleta, orelhas e pano de organdi são mergulhados na solução carrapaticida, que circunda a bacia da mesa de manipulação já descrita.

As larvas cheias e coletadas são passadas em tamizes lavadores, que constam de três cilindros, cuja base de tela de malhas progressivamente menores permite a retirada de detritos, como sejam pêlos, larvas mortas não alimentadas, etc. Um jacto dágua facilita esta limpeza e ao mesmo tempo retira os detritos orgânicos, que, conforme temos verificado, podem permitir não só a colagem das larvas umas às outras, como também servem de meio para o crescimento de certos parasitas durante a permanência das metalarvas na estufa, à espera da ecdise.

Uma vez bem lavadas, as larvas cheias são colhidas por um aparelho especial de coleta, que, por meio de vácuo, permite reuní-las diretamente nos nossos tubos de contenção.

Para facilitar a secagem, pode-se expor as larvas à corrente de ar de um ventilador ou deixá-las durante algum tempo na estufa a 37°C.

Lavadas e secas, as larvas cheias são distribuidas nos tubos de contenção e guardadas nos tubos de proteção, onde à temperatura ambiente ou na estufa para carrapatos, permanecem até ocorrer a primeira metamorfose com a ecdise das neoninfas.

4. Fase ninfal — 2.ª alimentação infetante

1.ª metamorfose. Período prévio à ecdise das neoninfas

Decorridos alguns dias, as metalarvas ou larvas alimentadas transformam-se em neoninfas, efetuando-se, desta forma, a primeira metamorfose, isto é, a passagem da fase larval ou hexápoda para a fase ninfal ou octópoda. O período de tempo compreendido entre a colheita das larvas alimentadas e a saída das primeiras neoninfas denominamos período prévio à ecdise das neoninfas.

No quadro seguinte vêm-se os resultados globais de experiências feitas com 7.000 metalarvas, correspondendo à observação de 152 lotes diferentes, mantidos em estufa com temperatura entre 30 e 32°C.

Os lotes de metalarvas foram obtidos do seguinte modo:

Entre as larvas cheias e espontaneamente desprendidas de orelhas de coelhos, foram selecionados 100 exemplares, que, após lavagem e secagem prévias, foram divididos em dois lotes de 50 e mantidos durante a experiência nos tubos padrão de contenção protegida. Um dos lotes foi incubado em estufa regulada entre 30 e 32°C e o outro serviu para as experiências feitas à temperatura ambiente do laboratório relatadas adiante.

À medida que se processou a ecdise das neoninfas, estas foram retiradas diariamente de junto das metalarvas e colocadas em outro tubo de dupla proteção, mantido à temperatura ambiente do laboratório.

Os resultados aqui apresentados devem servir somente como índice prático de orientação, pois não se referem à evolução unitária. Com efeito, partindo de grande número de larvas alimentadas, não é praticável a anotação do momento exato do final da alimentação de cada unidade isoladamente e da conseqüente queda espontânea do respectivo hospedeiro. As larvas permanecem 8 a 10 dias nas orelhas dos coelhos, podendo-se fixar, alimentar e desprender em prazos diferentes.

Êstes resultados, portanto, se referem ao número de dias decorridos desde a colheita dos lotes de larvas até o dia em que se verifica a presença da primeira neoninfa nos tubos contendo 50 exemplares.

A ecdise das primeiras metalarvas se verificou entre 5 e 15 dias após a colheita das metalarvas, à temperatura de 30 — 32ºC. Na maioria dos lotes (91.4%) esta teve inicio entre o 7.º e 13.º dia.

1.ª Metamorfose: Periodo prévio à ecdise das neoninfas. Temperatura 30 — 32ºC		
Dias	N.º de lotes	%
5	5	3.3
6	2	1.3
7	21	13.8
8	21	1 .1
9	17	15.7
10	24	19.7
11	30	10.5
12	16	6.5
13	10	2.6
14	4	1.8
15	2	
Total de lotes	152	

A outra experiência com os lotes de larvas da mesma procedência que a dos utilizados na prova anterior, foi feita à temperatura variável do ambiente do laboratório.

Tratando-se de Ixodidas alimentados em meses diferentes, os resultandos são dados separadamente, pois a temperatura ambiente do laboratório variou de alguns graus em cada periodo:

1.ª Metamorfose: Período prévio à ecdise das neoninfas. Temperatura ambiente do laboratório.

Dias	Colheita 19-4-43	11-5-43	22-6-43
7	1		
8	1		
9	2		
10	4		
11	4		
12	6		
13	4		
14	6		
15	4		
16	5		
17	3		
18	—		
19		2	
20		0	
21		6	
22		8	
23		7	
24		10	
25			5
26			1
27			2
28			6
20			2
30			7
31			5
32			9
33			3
34			8
35			1
Total de lotes	40	33	49

Iniciada a experiência com 152 lotes de metalarvas, somente em 122 foi verificado início de eclosão. Nos demais 30 lotes as metalarvas não evoluiram, não sendo, porisso tomados em consideração.

São particularmente significativos os resultados desta observação. Larvas alimentadas em meses diferentes, durante os quais a temperatura ambiente do laboratório baixou progressivamente, mostraram um período prévio à eclosão das ninfas relacionado a essas variações de temperatura. Nos meses mais frios, junho e julho, foi maior o número de dias decorridos até se verificar o início da eclosão das neoninfas. Nas colheitas feitas no mês de abril, o período prévio à primeira metamorfose foi de 7 dias para a metalarva de evolução mais rápida e de 17 dias para as de evolução mais retardada. Nos lotes colhidos a 11 de maio, o período prévio variou entre 19 e 24 dias, enquanto que para

os lotes de Ixodidas colhidos a 22 de junho foram necessários 25 dias para se verificar a primeira eclosão de neoninfas nos diferentes lotes, sendo que em um dos tubos somente após 35 dias foram encontradas as primeiras neoninfas.

Em São Paulo, as temperaturas mais baixas do ano correspondem aos meses de junho, julho, atingindo a média das mínimas 9-10°C e a das máximas 21 — 22°C. Em maio e abril as médias são mais elevadas, havendo quase sempre uma diferença de mais ou menos 2°C entre um mês e outro. No interior do laboratório as médias das mínimas mostram-se sempre mais elevadas, 16°C para junho e julho, e as oscilações entre a máxima e a mínima nesse período não ultrapassaram 2°C. Essas oscilações, entretanto, foram maiores nos meses de maio e sobretudo de abril.

1.ª metamorfose — Período próprio à ecdise das neoninfas

O tempo decorrido entre a ecdise da primeira neoninfa e a ecdise da última viável de cada lote, denominamos "periodo próprio á ecdise das neoninfas".

À temperatura de 30 — 32°C foram obtidos os seguintes resultados:

1.ª Metamorfose — Periodo próprio à ecdise das neoninfas. Temperatura 30 — 32°C

Dias	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Total de lotes
1a. Exp.	—	2	1	12	13	4	1	3	—	52
2a. Exp.	—	—	13	7	11	10	12	—	1	50
3a. Exp.	7	8	20	9	10	—	2	6	—	50
Total	7	10	34	28	34	14	15	9	1	152
%	4.6	6.5	22.3	18.4	22.3	9.2	9.8	5.9	0.6	

O tempo de ecdise oscilou, no conjunto de lotes observados nas três experiências, entre 6 e 14 dias. Levando-se em conta os resultados totais, pode-se considerar como mais freqüente a demora de 8 a 12 dias para a ecdise completa das neoninfas viáveis.

As verificações feitas para a determinação do período próprio á ecdise das neoninfas á temperatura ambiente nos meses de junho e julho (médias das temperaturas máximas inferior a 18°C), evidenciaram precariedade de evolução, dando lugar á obtenção de ecdise satisfatória somente em pequeno número de lotes. Assim é que, partindo de 172 lotes de metalarvas que iniciaram ecdise, obtivemos apenas 23 lotes com evolução normal. Êsses 23 lotes tiveram um período próprio de 12 a 18 dias, sendo que mais freqüentemente de 17 dias.

Tomando em consideração o período necessário para ser obtida a 1a. metamorfose, isto é, desde o momento da colheita das metalarvas até a ecdise de todos os elementos viáveis, os resultados observados à temperatura de 30 — 32°C foram os seguintes:

1.ª Metamorfose — Temperatura 30 — 32°C					
Dias	1.ª Exp.	2.ª Exp.	3.ª Exp.	Total	%
15	4			4	2.6
16	6			6	3.9
17	25		2	27	17.8
18	10		—	12	7.8
19	—	2	22	25	16.4
20	7	3	1	12	7.8
21		4	16	39	25.6
22		23	2	18	11.8
23		16	6	8	5.2
24		2	1	1	0.6
Total	52	50	50	152	

Verifica-se, então, que nos diferentes lotes a ecdise completa variou de 15 a 24 dias.

Rendimento

No que diz respeito ao rendimento, já mostramos como foi pequeno quando os Ixodidas foram mantidos à temperatura ambiente nos meses mais frios do ano. Ao contrário, foi particularmente elevado na criação feita à temperatura de 30°C; desta sorte, dos 152 lotes estudados observamos:

36 lotes com 100% de ecdises
41 " " mais de 80 e menos de 100% de ecdises
15 " " " 60 " 80% "
27 " " " 40 " 60% "
23 " " " 20 " 40% "
10 " com menos de 20% de ecdises.

Os resultados destas experiências demonstram que durante os meses frios, que coincidem com a 1a. metamorfose dos Ixodidas criados no loboratório, as temperaturas são desfavoráveis à evolução dos Ixodidas e que, pelo contrário, à temperatura de 30°C a evolução decorre de maneira satisfatória na quase to-

talidade dos lotes de metalarvas. Aconselhamos, entretanto, para criação em larga escala do *Amblyomma cajennense* na fase larvo-ninfal, utilizar temperaturas entre 22 — 28°C no máximo. A permanência a temperaturas mais elevadas não é aconselhável, pois é grande a mortalidade verificada entre os exemplares que sofrem a metamorfose nos primeiros dias e permanecem à espera da evolução das metalarvas restantes.

A criação de Ixodidas em nosso Laboratório é rotineiramente feita entre 24 e 26°C, sempre que se deseja apressar a evolução da fase de larva para a de ninfa. Recomendamos, entretanto, manter constante observação, para não prolongar desnecessariamente a permanência na estufa. E' mesmo indispensável levar os lotes de carrapatos logo após a ecdise da maioria das neoninfas para temperaturas mais baixas até o momento da alimentação ou proceder à retirada diária das neoninfas ecloidas de junto das metalarvas mantendo-as a seguir a temperatura mais baixa (20°C ±). Esta separação facilmente se consegue mediante o uso do aparelho adaptado para trabalhos com grandes quantidades de metalarvas.

Modificações dos aparelhos para trabalhos com grande quantidade de metalarvas

Para grandes quantidades de larvas cheias utilizamos por vezes um dispositivo, que pode conter 40.000 larvas ou mais. Este aparelho, confeccionado sob os mesmos princípios de dupla proteção, permite colher as neoninfas diretamente

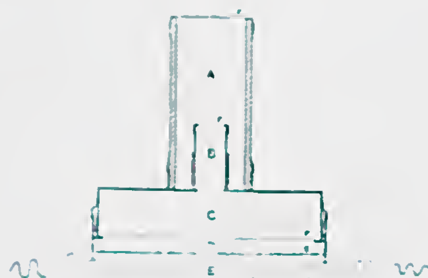


Fig. 27

Esquema do aparelho para criação de ninfas e adultos em grande quantidade. A = Tubo de proteção; B = Tubo de contenção removível; C = Câmara para o depósito de Ixodidas; D = Caixa para a dupla proteção inferior; E = Areia umidecida; F = Tecido de organdi à prova de carrapatos; G = Tela de arame fino.

em tubos de contenção à medida que se processa a ecdise. Evitamos, desta sorte, o uso do aparelho de vácuo, que, quando não manobrado com cuidado, pode trazer prejuizo aos carrapatos em conseqüência do violento movimento a que são sub-

metidos. As neoninfas logo após a ecdise, orientadas pelo fototropismo positivo, passam do interior do aparelho, que permanece ao abrigo da luz, para os tubinhos de contenção, situados na parte externa, sendo assim coletadas espontaneamente nos tubinhos, que são substituidos à medida que contenham um número razoável de exemplares. A montagem do aparelho permite a fácil substituição dos tubos de contenção.

Nas melhores condições, a retirada dos tubos de contenção é feita cada 24 horas depois de iniciar a ecdise dos primeiros exemplares. Os tubos de contenção que contêm as neoninfas coletadas espontaneamente, isentas de pêlos ou outros detritos, são fechados, numerados e colocados nos tubos de proteção comuns, sob a camada de areia umidecida, onde então permanecem à espera do momento propício à alimentação.



Fig. 28
Aparelhos para criação de ninfas e adultos em grande quantidade.

A fotografia e o desenho mostram melhor do que qualquer descrição a montagem e funcionamento deste aparelho. A circulação de ar umidecido se faz perfeitamente à custa de evaporação da água que embebe a areia na grande bandeja, onde são depositados os aparelhos. O tecido de organdi ou tela fina de arame que protege o fundo de cada aparelho permite a livre circulação de ar necessário ao desenvolvimento dos Ixodidas, ao mesmo tempo que veda a passagem dêstes para o exterior.

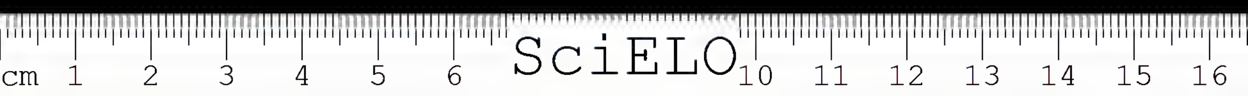
Para trabalhos a temperaturas mais elevadas, quando se deseja apressar a evolução dos Ixodidas, êste dispositivo tem particular aplicação. À medida que se colecionam as neoninfas nos tubos de contenção, estas podem imediatamente ser transportadas para temperaturas mais baixas à espera do momento adequado par se proceder a 2.ª alimentação infetante.

Descrição da ninfa

Corpo — Oval largo. Comprimento (antes de sugar) 1.38, largura 1.14. *Capitulo* — Comprimento 0.42, largura da base 0.3. Base subquadrada, margens laterais convexas, *cornua* inconspícuas ou ausentes, margem posterior côncava ou quase reta. Superfície lisa, sem pontuação. Palpos longos e com alguns pêlos finos. Comprimento total dos artículos II e III, 0.24. *Hipostôma* — Espatulado, de comprimento médio, levemente fendido no ápice. Dentição 2/2. Comprimento cêrca de 0.24. *Escudo* — Comprimento 0.66; largura 0.84. Cordiforme largo, mais largo do que longo, largura máxima mais ou menos no meio, com escápulos arredondados. Sulcos cervicais fundos e longos, atingindo as proximidades das margens póstero laterais. Olhos grandes, pálidos, meio convexos. Com número médio de pontuações pequenas, apagadas, vistas melhor à luz refletida. *Patas* — Sem espinhos ventrais na extremidade distal dos tarsos. Comprimento do tarso I, 0.42; do metatarso, 0.24. Comprimento do tarso IV, 0.30; do metatarso, 0.21. *Coxas* — Coxa I com dois espinhos distintos, o interno menor. Coxas II, III e IV cada uma com um só espinho. Todos os espinhos curtos e os das coxas II, III e IV chatos e relativamente mais estreitos do que em *americanum*. *Placa espiracular* — Larga, quase plana, porém aprofundada na abertura respiratória. Comprimento 0.21, largura 0.14. (Cooley, R. A. & Kohls, G. M.) (31).

Alimentação infetante das ninfas

Período de espera. — Como vimos anteriormente, as neoninfas são colecionadas em número adequado nos tubinhos de contenção e mantidas em geral à temperatura do laboratório até decorrer o tempo de espera necessário à alimentação. Ainda aqui, do mesmo modo que para o caso das larvas, a quitinização das patas das neoninfas, avaliada pela côr pardacenta que apresentam, é, sem dúvida, um bom índice para avaliar o momento adequado à alimentação das ninfas. Quando a quitinização é verificada em cêrca de 100% das neoninfas, elas são colocadas nos coelhos. Além disso, devemos tomar como ponto de referência a menor repleição das neoninfas que decorre do jejum a que são submetidas e que pode ser avaliada pelo seu menor diâmetro (as neoninfas se mostram mais chatas) e maior transparência. À temperatura do laboratório pode-se calcular em 30 — 40 dias êsse período de espera, sendo preferível, quando se visa criação em larga escala, pecar pela discreta dilatação dêsse período, a diminui-lo, pois os resultados percentuais de rendimento são ligeiramente maiores.



Técnica de alimentação. — A técnica empregada para alimentar ninfas é, na rotina, a mesma usada para alimentação de larvas, isto é, são colocadas em orelhas de coelhos infetados e estas envoltas pelos saquinhos de organdi protegidos contra dilacerações pelo protetor de couro.

Também outras técnicas podem ser empregadas, mas sem maiores vantagens sôbre as acima assinaladas. Assim, podem-se utilizar, por exemplo, coelhos depilados no tronco e abdomem, protegidos com uma camisa de organdi fixada nas extremidades com esparadrapo e, por cima desta uma tela de arame fino



Fig. 29
Ninfas de *Amblyomma cajennense.*

ajustada ao corpo do animal. Êsse processo tem a vantagem de oferecer maior superfície à alimentação dos Ixodidas, que não se aglomeram tão intensamente como acontece quando são colocados nas orelhas. Êste método, entretanto, afasta-se da técnica standard, necessita da confecção de novos aparelhos e, sobretudo, exige manipulação fóra da mesa de proteção, não sendo, porisso, adotado entre nós.

Outro dispositivo que pode ser empregado é o usado para a alimentação de adultos (vide "Técnica de alimentação de adultos").

A manipulação das ninfas requer maiores cuidados do que a de larvas. Tratando-se de Ixodidas já infetados na fase larval, podem transmitir a infecção

ao homem. Porisso, toda e qualquer manipulação deverá ser feita sempre nas mesas de proteção, com os auxiliares protegidos pelas luvas adequadas, obedecendo rigorosamente à técnica standard.

Os coelhos utilizados para alimentação das ninfas são mantidos nos compartimentos isolados do biotério pelo espaço de 8-10 dias, até a colheita das metaninfas.

Colheita das metaninfas. — As metaninfas (ninfas alimentadas) são colhidas das orelhas dos coelhos de idêntico modo ao das larvas alimentadas. Os animais sacrificados por pancada na cabeça, são mantidos no biotério pelo espaço de 3-4 horas até se verificar a coagulação do sangue no animal.

Cortam-se as orelhas pela base por meio de tesouras e, uma vez numeradas, são levadas em bandejas para a mesa de proteção, onde são manipuladas. Abertos os saquinhos de organdi, as ninfas são colecionadas em tamises lavadores. As que ainda estiveram fixadas às orelhas são despregadas por meio de manobras delicadas com uma espátula.

Após cuidadosa lavagem sob jacto dágua corrente, são levadas a secar em estufa a 37°C ou mesmo com auxilio de ventiladores. Terminada esta fase, procede-se à distribuição nos tubos de proteção (50 a 70 para os pequenos e 2500 a 2000 nos grandes). Os recipientes de dupla proteção contendo as metaninfas são levados à estufa, onde são retidos até se verificar a 2a. metamorfose com a ecdise dos adultos.

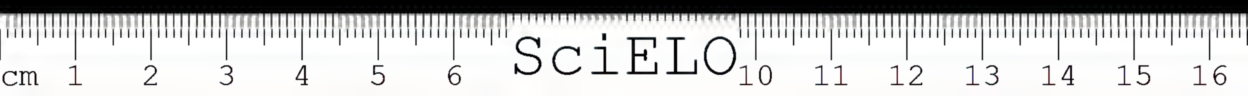
5. Fase adulta — Alimentação estimulante

Período prévio à ecdise de adultos

Êste periodo é o que precede a segunda metamorfose, isto é, a passagem da fase de ninfa para a de adulto. Compreende o tempo que decorre entre o fim da alimentação das ninfas (metaninfas) até verificar-se em um lote a saída dos primeiros exemplares adultos.

Os resultados obtidos nas verificações feitas com 50 lotes de metaninfas estão resumidos no quadro abaixo. Foram estudados 2.500 exemplares, pois cada lote de metaninfas contou com 50 unidades.

O periodo prévio à ecdise variou entre 9 e 12 dias apenas. Na maioria dos lotes o inicio da ecdise ocorreu no 11.° dia, quando em aproximadamente 44% dos lotes se observou saída dos primeiros exemplares adultos.



Período próprio à ecdise de adultos Temperatura 30 — 32°C		
N.° de dias	N.° de lotes	%
9	8	16
10	17	34
11	22	44
12	3	6
Total	50	

Período prévio à ecdise de adultos Temperatura 30 — 32°C		
N.° de dias	N.° de lotes	%
5	13	26
6	23	46
7	9	18
8	4	8
9	1	2
Total	50	

Período próprio à 2.ª metamorfose

Nas observações feitas com os mesmos lotes da experiência anterior póde-se concluir que o período próprio à ecdise de adultos mantidos em temperatura entre 30 e 32°C oscilou entre 5 e 9 dias. Em 23 lotes de Ixodidas (46%) a saída dos adultos se processou durante 6 dias.

2.ª metamorfose

Si computarmos todo o período de tempo necessário à verificação da 2a. metamorfose, isto é, o tempo decorrido entre a alimentação das metaninfas e a ecdise de todos os exemplares contidos em cada lote, verificamos que para a obtenção da 2a. metamorfose são necessários de 14 a 19 dias, a maioria necessitando 16 e 17 dias para completa evolução, como se verifica no quadro abaixo. Na prática, portanto, os lotes de metaninfas devem permanecer 20 dias na estufa regulada entre 30 a 32°C para se obter a ecdise de *Amblyomma cajennense* adultos.

2.ª Metamorfose — Temperatura 30 — 32°C		
N.° de dias	N.° de lotes	%
14	1	2
15	6	12
16	21	42
17	12	24
18	5	10
19	5	10
Total	50	

Rendimento

Os rendimentos encontrados neste lotes de Ixodidas foram bastante satisfatórios sob o ponto de vista prático, quando se utilizaram temperaturas variáveis entre 30 e 32ºC.

Precisamos, no entanto, novamente frizar aqui, que a estas temperaturas necessário se torna ir retirando os adultos de junto das outras ninfas ou detritos, pois não é conveniente mantê-los a estas temperaturas.

A utilização dos aparelhos que permitem a separação natural dos exemplares que se vão libertando dos detritos, permite obter de maneira simples esta separação diária.

Em mais de 60% dos Ixodidas observados nos diferentes lotes, o rendimento variou entre 80 e 90%, o que consideramos bastante satisfatório.

Resumimos no quadro seguinte as percentagens obtidas quanto ao rendimento:

Rendimento durante a 2.ª metamorfose. Temperatura 30 — 32ºC		
	N.º de lotes	%
Entre 30 e 50	3	6
» 50 e 60	2	4
» 60 e 70	5	10
» 70 e 80	7	14
» 80 e 90	29	58
» 90 e 100	4	8
	50	100

A evolução de *Amblyomma cajennense* no transcorrer da 2a. metamorfose pode ser muito mais demorada quando as metaninfas permanecem à temperatura ambiente do laboratório até a ecdise dos adultos. Em observações feitas com lotes de metaninfas colhidas na mesma ocasião das utilizadas na experiência anterior e procedentes dos mesmos coelhos, verificou-se um rendimento praticamente nulo, sendo mínima a quantidade de adultos obtidos e a perda superior a 80%. Durante os meses mais frios do ano (junho, julho) observou-se um período prévio à ecdise dos adultos variável entre 23 e 60 dias, com grande irregularidade entre os diferentes lotes, sendo que na maioria os primeiros exemplares adultos foram vistos entre o 35 e o 45 dias após a colheita das metaninfas.

Uma segunda experiência foi levada a têrmo com outros 50 lotes de metalarvas colhidas a 11 de outubro e observadas durante outubro e novembro. Foram os seguintes os resultados obtidos:

Período prévio à ecdise de adultos. Temperatura ambiente (Meses: outubro e novembro)		
N.º de dias	N.º de lotes	%
23	17	34
24	17	34
25	5	10
26	6	12
27	—	—
28	2	4
29	1	2
30	1	2
Total	50	

Período próprio à ecdise — Temperatura ambiente (Meses: outubro e novembro)		
N.º de dias	N.º de lotes	%
10	1	2
11	3	6
12	8	16
13	4	8
14	9	18
15	6	12
16	2	4
17	2	4
18	5	10
19	6	12
20	4	8
Total	50	

Comparando êstes resultados com os obtidos nas experiências feitas à temperatura de 30 — 32ºC, verifica-se grande diferença no número de dias necessários para a 2a. metamorfose. À temperatura constante de 30 — 32ºC, o período prévio à ecdise de adultos oscilou entre 9 e 12 dias, enquanto que nos lotes mantidos à temperatura ambiente do laboratório nos meses de outubro e novembro, o início da ecdise só foi verificado a partir do 23 dias da colheita das ninfas alimentadas. Para o período próprio à ecdise o mesmo se observa. A 30 — 32ºC, a mudança da pele se faz nos diversos lotes durante 5 a 9 dias, ao passo que nesta última experiência, entre 10 e 20 dias. Nos meses de outubro e novembro a média das temperaturas máximas no laboratório foi de 25ºC e a média das temperaturas mínimas de 15ºC.

Conservação dos adultos destinados ao preparo da vacina

À medida que os exemplares adultos de *Amblyomma cajennense* se libertam do envoltório externo da fase anterior de ninfa, devem ser coletados e conservados convenientemente até o momento de ser utilizado no preparo da vacina.

Os Ixodidas adultos são colocados em número variando entre 150 e 200 em pequenas caixas circulares de cartolina com 5 cm de diâmetro e 1 1/2 cm de altura. As caixinhas são fechadas por uma fita de esparadrapo e colocadas em número de 10 em bolsas de organdí. Estas bolsas fechadas nas extremidades com um pedaço circular de esparadrapo servem de proteção contra eventuais acidentes. Assim acondicionadas, as caixinhas contendo os carrapatos são guardadas em caixas metálicas capazes de conter 21 bolsas. Cada caixa pode, portanto, guardar em média 4.000 Ixodidas, machos e fêmeas, infetados.

No fundo destas caixas há uma camada de algodão, que é mantida umedecida e que fica separada das bolsas por uma placa metálica perfurada, de modo a permitir um grau de umidade apropriado em todo ambiente interior da caixa sem umedecer por contato as caixinhas de cartolina.



FIG. 30
Conservação de *Amblyomma cajennense*, ♂ e ♀, infestados para o preparo da vacina.

As caixas metálicas, contendo os carrapatos na sua última fase evolutiva, permanecem na geladeira à temperatura regulada entre 10 e 15°C. A esta temperatura os Ixodidas podem ser conservados vivos durante longo período de tempo, até o momento da alimentação estimuladora. Os pesquisadores americanos, que trabalharam com *Dermacentor andersoni*, demonstraram a conveniência de prolongar êste estágio por um período mais ou menos longo, quase sempre durante um ano. Desta sorte, os carrapatos correspondentes à criação de um ano, só são utilizados no ano seguinte. Esta espera, segundo aquêles experimentadores, teria importância para a obtenção de melhores resultados após a alimentação estimulante, dando maiores quantidades de riquétsias e vacinas mais eficientes.

Sempre que possível, prolongamos o período de tempo em que os *Amblyomma cajennense* são mantidos com metabolismo diminuído em conseqüência da temperatura em que são

conservados, porém em média após seis meses e às vezes menos já os empregamos para o preparo da vacina, premidos pela necessidade de atender aos urgentes pedidos do produto, obtendo, entretanto, quase sempre vacinas altamente satisfatórias sob o ponto de vista protetor.

Alimentação estimulante

Nos Ixodidas adultos infetados e conservados por longo tempo em baixas temperaturas, as riquétsias reproduzidas no interior das células dos órgãos internos encontram-se em uma fase de atenuação de sua virulência. Suspensões dos órgãos internos dêsses Ixodidas, obtidas por trituração e separação da parte quitinosa, inoculadas em cobaias de prova, em geral só fornecem pequena percentagem de infecções benignas. Si 10 a 15 dias depois reinocularmos êsses animais com virus de passagens, êles se mostram na maioria protegidos contra a febre maculosa, o que põe indiretamente em evidência a presença nos carrapatos dos princípios antigênicos — as riquétsias.

Spencer e Parker provaram em experiências com o *Dermacentor andersoni*, que bastava manter os adultos à temperatura de 37°C durante 24 horas, para que fosse obtida u'a maior percentagem de infeções nos animais inoculados e mais ainda, que, si êstes carrapatos se alimentassem parcialmente em cobaias e fossem a seguir mantidos durante algum tempo à temperatura do laboratório, poder-se-ia obter de um só Ixodida um grande número de doses infetantes.

Foi com o uso de emulsões fenoladas a 0,5%, obtidas de triturados de Ixodidas adultos infetados, conservados em baixas temperaturas durante alguns meses e parcialmente alimentados por ocasião da trituração, que Spencer e Parker conseguiram provar a possibilidade de preparar vacinas capazes de, quando inoculadas em cobaias, conferir sólida imunidade perante a inoculação de prova feita com a injeção peritonial de 1 cm^3 de sangue de cobaia infetada.

Trabalhos feitos em nosso laboratório mostraram que os mesmos fatos se verificam com o *Amblyomma cajennense*, isto é, as riquétsias se reproduzem abundantemente nos Ixodidas após a prévia alimentação estimuladora, antes de serem utilizados para o preparo das emulsões destinadas ao fabrico das vacinas.

Foi possível, igualmente, comprovar que êste resultado pode ser obtido, quer utilizando cobaias, quer coelhos, para a alimentação final estimuladora. Ultimamente, temos dado preferência ao uso de coelhos, pela possibilidade de alimentar um número maior de exemplares.

Técnica para a alimentação estimulante

Preparo dos aparelhos. — Como dispositivo utilizado para a última alimentação dos adultos, empregamos artificio semelhante ao descrito por PARKER, constituido de pequenas bolsas protetoras, adaptáveis às partes laterais do animal préviamente depilado.

As bolsas ou receptáculos dos carrapatos são moldados em tela de arame fino, por meio de fôrmas de dimensões variáveis, de acôrdo com o tamanho do animal.

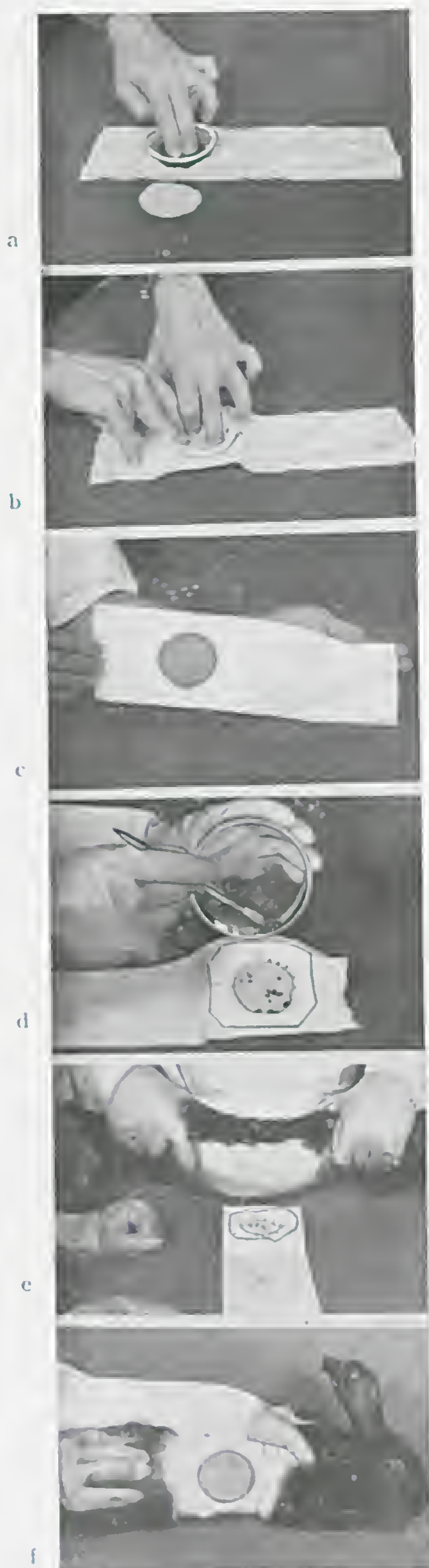
Em uma faixa de tecido adesivo — de 10 cm de largura, si fôr destinado a coelhos, e de 6 a 8 em cm, si fôr para cobaias — faz-se uma abertura circular de dimensões idênticas à parte saliente da bolsa ou receptáculo moldado na tela de arame, mantendo-se a parte adesiva do esparadrapo voltada para cima. Ajusta-se e encaixa-se a armação de arame da maneira indicada na Fig. 31, a; a seguir, recobre-se com tecido de organdi fino a parte interna do receptáculo, fixando-se com esparadrapo nos bordos internos (Fig. 31, b). Pode-se com êste dispositivo manter uma ventilação satisfatoria no interior das bolsas e, ao mesmo tempo, uma bôa proteção contra a saida dos Ixodidas. Podem-se preparar faixas contendo 1 ou 2 bolsas, devendo-se nêste ultimo caso fazer coincidir cada uma com a parte lateral depilada do coelho.

Colocação dos carrapatos adultos. — Coelhos ou cobaias devem ser previamente depilados na parte mediana, atingindo tanto o dorso, como o ventre. Os carrapatos retirados da geladeira são mantidos durante 24 horas na estufa a temperatura de 37°C. Por ocasião da colocação nos animais podem ser resfriados durante alguns minutos, para facilitar a colocação nos receptáculos. Mantem-se a faixa em cima de uma mesa e colocam-se no interior da bolsa a'a média de 250 Ixodidas (Fig. 31, c) (*), logo a seguir, o coelho seguro pelas patas anteriores e posteriores, é levado de encontro à faixa, de modo que a bolsa fique situada lateralmente, na parte depilada do coelho (Fig. 31, d). A faixa e então ajustada ao corpo do animal, fazendo-a aderir à pele. Tiras estreitas de esparadrapo completam a fixação nos limites externos da faixa (Fib. 31, e, f).

Com êste dispositivo pode-se manter uma suficiente proteção contra as tentativas do coelho no sentido de procurar retirar o mesmo. Pode-se, como precaução, manter as patas posteriores amarradas, porém temos dispensado essa medida por serem raros os acidentes.

Os coelhos assim preparados, são levados aos compartimentos isolados do biotério, utilizados para esta fase de alimentação. A parte dianteira das gaiolas, contendo os animais, é protegida por uma cortina de borracha, de modo a evitar que, no caso de desprender algum aparelho, os carrapatos transponham as barreiras constituidas pelas bacias de solução carrapaticida.

(*) Utilizar coelhos com pêso acima de 2 quilos ou cobaias com mais de 500 g. Quando se empregam cobaias, deve-se colocar de 75 a 100 adultos.



Tempo da alimentação estimuladora. — A alimentação estimuladora deve fornecer ao carrapato uma quantidade de sangue justamente suficiente para reativar a reprodução e a virulência das riquétsias que se encontram nos tecidos dos órgãos internos do Ixodida.

Há longo tempo sem alimentação e depois de permanecer 24 horas à temperatura de 37°C, os adultos se fixam facilmente nos animais.

Rotineiramente, retiramos os carrapatos dos coelhos ou cobaias depois de 4 a 6 dias. Êste prazo é regulado de acôrdo com o tempo e a temperatura a que foram submetidos os Ixodidas. Quanto maior a demora e mais alta a temperatura, tanto menor o número de dias necessários para se processar a alimentação estimuladora.

Colheita dos adultos após a alimentação estimuladora. — Os coelhos ou cobaias ainda vivos, contendo os Ixodidas, são fixados nas bandejas situadas no interior das mesas para manipulação protegida, onde se desprendem os aparelhos e, por meio de pinças especiais se procede à colheita tanto nos exemplares machos, como fêmeos.

Os carrapatos adultos ainda não totalmente alimentados, encontram-se fortemente fixados à pele do animal, do qual somente se destacam por tração. Ixodidas eventualmente lesados não podem mais ser usados para a vacina, pois morrem em seguida, entrando em decomposição, razão pela qual têm de ser eliminados.

Os exemplares fêmeos que se encheram demasiadamente, não devem ser utilizados para o preparo da vacina, no entanto podem ser guardados para iniciar a criação do ano seguinte ou então eliminados.

Colhidos um a um, os carrapatos são colocados em placas de Petri, agrupados em lotes de 500.

Antes de se iniciar o preparo da vacina pela trituração, êles devem permanecer à temperatura ambiente do laboratório durante 48 a 96 horas. Em geral, o máximo de virulência das emulsões feitas com os órgãos internos dos carrapatos se verifica entre 8 a 10 dias, contados a partir do momento em que os Ixodidas são colocados nos animais para a alimentação estimulante.

Contrôle de infecção com Ixodidas

É sempre conveniente na fase ninfal, verificar si a maioria das metaninfas foi infetada em conseqüência das duas alimentações anteriores. Para isto retiram-se, ao acaso, 10 exemplares de cada grande lote de metaninfas, 10-12 dias depois da colheita e tritura-se cada carrapato separadamente, de mistura com 2 cm³ de salina. A suspensão obtida é injetada em cobaias pela via subcutânea e observa-se os animais durante 15 dias. Quando se trabalha com a técnica e os cuidados por nós indicados, quase sempre a totalidade das ninfas mostra-se infetada.

Não aconselhamos fazer a prova de infecção após a primeira alimentação na fase larval, porque às vezes pode acontecer que, apesar das precauções tomadas para fazer coincidir a picada dos Ixodidas com a fase de circulação do virus no animal, o periodo de incubação da infecção se tenha prolongado demasiadamente

ou mesmo, devido a uma resistência individual imprevista, o animal não apresente virus na corrente sanguinea, a não ser por curto periodo de tempo, insuficiente para infetar todos os carrapatos que foram colocados no coelho. Pequena, evidentemente, será a probabilidade de que estas mesmas condições se reproduzam com o mesmo lote em uma segunda alimentação, na fase ninfal.

Na fase adulta é sempre aconselhável verificar a presença de riquétsias nos esfregaços feitos com os órgãos internos do carrapato, bem como avaliar a virulência que apresentam, o que poderá servir de índice prévio do valor antigênico provável das vacinas a serem preparadas com êsses Ixodidas.

Os esfregaços para a pesquisa de riquétsias deverão ser corados por um dos métodos usuais para a coloração destes microorganismos. Ultimamente temos com vantagem dado preferência ao de Machiavello, que fornece mais fácil e rapidamente bôas preparações. As riquétsias apresentam-se coradas em vermelho, destacando-se facilmente no interior das células coradas em azul.

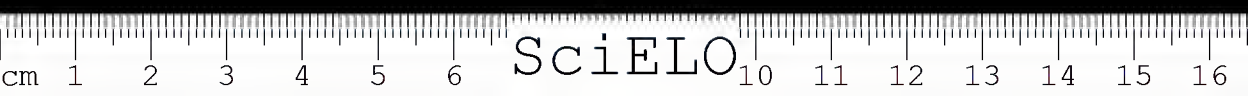
Para contrôle de infecciosidade procede-se do seguinte modo: Ixodidas retirados dos lotes de carrapatos adultos, que sofreram a alimentação estimulante e a seguir permaneceram 4 ou 5 dias à temperatura ambiente do laboratório, são dissecados para a retirada do conteúdo dos órgãos internos. Em gral esteril, com o auxilio de areia de quartzo, faz-se uma fina trituração de mistura com solução fisiológica na proporção de 1 cm^3 para cada Ixodida utilizado; centrifuga-se por alguns minutos para a retirada do quartzo e detritos celulares não bem desintegrados e utiliza-se o liquido sobrenadante para o preparo de diluições seriadas. Em cobaias de cêrca de 300 g injeta-se, pela via subcutânea, 1 cm^3 das diluições acima de 1/1.000, usando-se duas cobaias para cada diluição.

Para o preparo das vacinas deve-se empregar lotes de Ixodidas, que forneçam emulsões de atividade nunca inferior a 1.000 doses infetantes por adulto infetado. A produção de vacinas potentes depende diretamente da concentração do virus nos carrapatos que se utilizam para o seu preparo. Vacinas preparadas com Ixodidas que contenham 5.000 ou mais doses infetantes, são quase sempre altamente protetoras (SPENCER e PARKER).

O peso médio dos órgãos de um Ixodida isento da parte quitinosa não ultrapassa em geral 0.01 g, podendo-se avaliar, desta sorte, a grande concentração de virus, comparada com o número de doses infetantes existente no sangue de cobaias infetadas, onde raramente vai além de 1.000 por cm^3.

G — PREPARO DA VACINA

Terminada a descrição das técnicas utilizadas para criação do *Amblyomma cajennense*, finalidade principal dêste trabalho, relataremos resumidamente a maneira de preparar a vacina. A técnica é, aliás, idêntica à utilizada pelos inves-



tigadores americanos que trabalam com o *Dermacentor andersoni*. Aquêles diretamente interessados nos pormenores poderão recorrer aos artigos originais relacionados com o assunto; alguns dos mais informativos estão incluidos nas referências no fim dêste trabalho (32 a 34).

A vacina quase sempre é elaborada em pequenos volumes e à medida que os exemplares adultos infetados vão sendo submetidos à alimentação estimulante. Habitualmente, preparamos partidas de 500 ou 1000 cm^3. A maioria das elaborações é feita com volumes de meio litro.

A quantidade de Ixodidas pode variar entre 1 e 2 exemplares adultos para cada centímetro cúbico do produto final. O número de carrapatos a ser usado poderá ser avaliado, quer pelo número de doses infetantes encontradas nas diluições do triturado dos Ixodidas do lote utilizado, quer pelos resultados do valor antigênico das partidas elaboradas, determinando-se, então, por experiências repetidas, qual a concentração mais adequada para obter, com regularidade, resultados satisfatórios.

Como norma orientadora pode-se utilizar um carrapato e um quarto ou um carrapato e meio para cada centímetro cúbico de vacina. É esta a mesma proporção usada nos laboratórios de Hamilton e que tem, igualmente, dado bons resultados e de forma regular, quando se emprega o *Amblyomma cajennense*.

Para o preparo de uma partida de meio litro, empregamos quase sempre 750 Ixodidas vivos, machos e fêmeas, infetados, isto é, um carrapato e meio para cada centímetro cúbico de vacina.

1. Trituração, desintoxicação e purificação

Preparo dos carrapatos, desinfecção. — Selecionados e separados de detritos ou excreções, os carrapatos são colocados em contacto com solução salina formolada a 4%, durante alguns minutos, para desinfeção rápida da parte externa. A seguir são repetidamente lavados em água destilada ou mesmo água corrente e colocados em um provete, cobrindo-os com solução de mertiolato de sódio (1:1.000), em contacto com a qual devem os carrapatos permanecer durante 48 horas à temperatura ambiente. A seguir são lavados 2 ou 3 vezes com solução salina formolada a 0,4% e fenicada a 1,6%, deixando-se escorrer bem todo o líquido, de modo a ficarem apenas úmidos; então, estão prontos para a trituração.

Trituração. — A trituração é feita em gral mecânico ou manual, no interior de uma mesa de câmara de proteção (*), com auxílio de quartzo esteril ou,

(*) A mesa para trituração é utilizada não só para o preparo da vacina, como ainda para manipular qualquer material, carrapatos ou órgãos de animais infetados, destinados às inoculações rotineiras.

simplesmente, congelando previamente os carrapatos, mantendo-os durante a noite no frigorífico à temperatura de — 15°C.

A mesa para trituração é um modelo simplificado da mesa de proteção já descrita (p. 59); apenas não possui tanque para solução carrapaticida. A câmara protetora tem guarnições de metal e é envidraçada de modo a permitir ampla visibilidade; os auxiliares trabalham ao abrigo de contaminações, protegidos com longas luvas de borracha, adaptáveis às aberturas laterais. Dentro da mesa, antes



Fig. 32
Mesa para trituração de carrapatos e manipulação de material infetado em geral.

de iniciar o trabalho, colocam-se: grais com os carrapatos a triturar; frascos com solução salina formolada a 0,4% e fenicada a 1,6%; copos e provetas graduadas; funis montados com gase esteril; frascos estereis de 500 cm³ de capacidade com rolhas de vidro esmerilhado, etc.

Fechadas as aberturas, pode-se iniciar a trituração dos Ixodidas: inicialmente, sem acréscimo de líquido e a seguir, juntando-se lentamente a cada gral pequenos volumes de solução formolada-fenicada, até que os carrapatos estejam perfeitamente desfeitos. Terminada a trituração, faz-se uma espécie de rinsagem do conteúdo do gral, utilizando nas diversas lavagens solução de fenol-formol até completar o volume de 125 cm³, ao mesmo tempo que se vai fazendo o transvasamento do liquido para um frasco de 500 cm³ de capacidade, contendo pérolas de porcelana. A manobra de extravasamento poderá ser feita por meio de funil montado com gaze, com a finalidade de reter as carapaças dos Ixodidas ou detritos mais grosseiros. Os frascos contendo a suspensão bruta são então fechados e rotulados com o número da partida em elaboração.

Todo o material utilizado para a trituração permanece dentro da câmara, exposto a vapores de formol até o dia seguinte, para o que se derrama, em cada gral utilizado, algumas gotas de solução de formol a 40%. No dia seguinte, abre-se a câmara e se retiram os frascos; todo o material usado é levado à Seção de esterilização.

Desintoxicação. — Os frascos contendo o produto da trituração dos carrapatos são guardados na geladeira (8 a 10°C-), onde permanecem durante 10 dias; diariamente, são agitados durante 15 a 20 minutos com auxílio de um agitador mecânico.

Decorrido êsse prazo, completa-se o volume de 500 cm³, adicionando 375cm³ de solução fisiológica esteril. O produto final a ser purificado contem, pois, 0.1% de formol e 0.4% de fenol.

Purificação. — A purificação visa eliminar todos os detritos da trituração dos Ixodidas, bem como uma parte grosseira do produto que foi precipitado pela ação do formol e do fenol.

Após 10 dias de desintoxicação, a suspensão é centrifugada a uma velocidade de 1.600 rotações por minuto durante 30 minutos. O liquido sobrenadante constitui a vacina purificada. Decanta-se, para retirar o sobrenadante e guarda-se o produto em frascos apropriados, tendo-se o cuidado de retirar uma amostra (20cm³) para contrôle de esterilidade, inocuidade e verificação da capacidade antigênica da vacina.

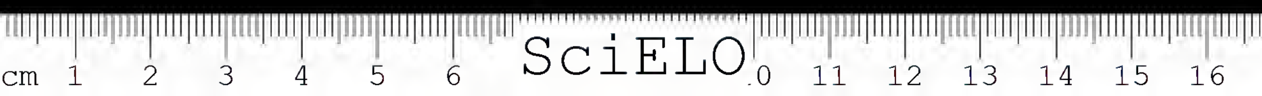
A centrifugação do produto bruto não precisa ser feita logo após decorridos os 10 dias necessários para a esintoxicação. Mantida na geladeira à temperatura não inferior a 5°C, a suspensão pode ser conservada, sem inconveniente, durante algum tempo, à espera do momento mais apropriado para se proceder à purificação e distribuição.

Distribuição. — A distribuição do produto é feita em vidros com rolha de borracha perfurável para vacinação individual (6 cm³) ou coletiva (30 cm³). Retiram-se de cada partida algumas unidades para o segundo contrôle de esterilidade. O produto final dêve ser conservado à temperatura entre 12 e 15°C.

2. Prova de esterilidade, inocuidade e capacidade antigênica

A prova de esterilidade é feita com o fim de afastar a possibilidade da presença de contaminações por germes aeróbios e anaeróbios, utilisando-se as técnicas empregadas no Instituto Butantan para produtos biológicos em geral.

A prova de inocuidade e a determinação do valor vacinante das diferentes partidas é feita em cobaias de cêrca de 300 g de peso. Seis animais de prova são inoculados com 1 cm³ de vacina pela via subcutânea e a seguir observados durante



12 dias. Não devem diminuir de peso, apresentar reações no local de inoculação ou mostrar elevação térmica acima de 39.6°C.

Decorridos os 12 dias, as cobaias de prova, bem como duas testemunhas, são inoculadas pela via peritoneal com 0.5 cm³ de sangue citratado de cobaia infetada, obtido por punção cardíaca no segundo ou terceiro dia de reação febril. Afim de tornar mais uniforme a atividade dos virus usados nas diferentes provas, visto que costumam ser grandes as variações do número de doses infetantes no sangue de diferentes animais infetados e não ser praticável avaliar quantitativamente a atividade do virus em cada prova, procedemos do seguinte modo:

Um mínimo de 5 animais, utilizados para fornecer o material infetante, recebem previamente pela via peritoneal virus de passagem, oriundo de caso humano de febre maculosa ou isolado de Ixodida naturalmente infetado. Todos os animais são sangrados na véspera do dia previsto para a inoculação e o volume de sangue citratado de cada cobaia é mantido na geladeira à temperatura entre 0 e 5°C durante 15 a 18 horas, enquanto se processa a prova de esterilidade para afastar a possibilidade de contaminações devidas a bactérias. No dia seguinte faz-se a mistura do sangue esteril, usando-a para a prova de antigenicidade da vacina.

Procedendo-se dêste modo, é sempre conveniente juntar várias partidas de vacina para fazer a prova na mesma ocasião e com a mesma mistura de virus.

Os animais vacinados e inoculados com virus de passagem continuam a ser observados durante mais 15 dias, registrando-se as temperaturas tomadas duas vezes ao dia: pela manhã e à tarde. Depois dêste prazo, tanto as cobaias de prova, como as testemunhas ainda vivas, são sacrificadas e necropsiadas para observar eventuais lesões macroscópicas.

O comportamento dêstes animais constituirá um indice prático da avaliação do poder vacinante da partida de vacina elaborada, desde que as testemunhas apresentem infecção típica, isto é, periodo de incubação de 3 a 5 dias, quadro térmico caraterístico, podendo ou não morrer da infecção, mas apresentando sempre, após a morte espontânea ou quando necropsiadas, após serem sacrificadas, as lesões macroscópicas mais freqüentemente encontradas na febre maculosa experimental: esplenomegalia acentuada, exsudação periesplênica e perihepática, congestão das suprarrenais e, por vezes, reação escrotal mais ou menos intensa. A pesquisa de riquétsias poderá ser feita nos animais mortos ou sacrificados, em preparações obtidas de raspados da parede peritoneal, o que é, desnecessário, pois que se trata de virus de passagens em cobaias, bem estudado. Quando as testemunhas não apresentarem um comportamento dêste tipo, a prova deverá ser repetida.



Os resultados são referidos da seguinte maneira, classificando-se as partidas de vacina em quatro graus diferentes:

1. *Vacina ótima* — As 6 cobaias são totalmente protegidas: não apresentam reação térmica durante o periodo de observação e, sacrificadas, não mostram lesões macroscópicas, caraterísticas da febre maculosa;

2. *Vacina bôa* — Somente uma cobaia tem reação térmica mais ou menos caraterística, morrendo ou não da infecção. As demais são totalmente protegidas;

3. *Vacina regular* — Duas entre as 6 cobaias reagem febrilmente, morrendo ou não da infecção, as restantes não têm elevação térmica, nem quando necropsiadas apresentam lesões evidentes de febre maculosa;

4. *Vacina sem valor* — Mais de duas reagem tèrmicamente de forma caraterística, morrendo da infecção ou apresentando à necrópsia lesões caraterísticas.

H — APLICAÇÃO DE VACINA. VACINAÇÃO

1. Doses

As pessoas adultas devem receber três injeções de 2 cm^3 pela via subcutânea. Crianças com menos de 10 anos recebem três doses de 1 cm^3.

É de todo conveniente repetir as vacinações com relativa freqüência, principalmente entre indivíduos residentes em locais onde há constante aparecimento de casos de febre maculosa, em conseqüência da existência de abundante quantidade de carrapatos infetados. Nestes casos, a revacinação com 1 ou 2 doses deverá ser feita pelo menos anual — ou, melhor ainda, semestralmente.

2. Reações

As reações observadas nas inúmeras pessoas vacinadas com a vacina preparada em nosso laboratório nestes últimos anos são relativamente benignas, só raramente aparecem individuos com sensibilidade exagerada ao material vacinante, sem, no entanto, acarretar conseqüências maiores de molde a dificultar a vacinação generalizada. Elas são de ordem local e geral. A reação local traduz-se por edema e eritema, mais ou menos acentuados. A reação geral acarreta febre, geralmente pouco acentuada, e, raramente, calefrios e dores pelo corpo.

3. Resultados

O julgamento do valor preventivo para o homem, de uma vacina desta natureza, feito em focos, onde os casos aparecem com bastante irregularidade, é sempre difícil, principalmente quando ainda o tempo decorrido desde o início da campanha de vacinação preventiva não permite esclarecer de modo decisivo até onde a vacinação foi eficiente. Os dados obtidos pela aplicação da vacina de SPENCER e PARKER, nos Estados Unidos e entre nós durante alguns anos são bastante animadores, porém confirmam que proteção satisfatória só se obtem com vacinações repetidas (35,36).

Nos serviços do laboratório desde a ocorrência dos casos fatais nas pessoas do DR. LEMOS MONTEIRO e seu auxiliar, SR. EDISON DIAS, não foram verificados novos acidentes. Acreditamos que realmente a vacinação e revacinação constante dos técnicos tenham concorrido de maneira eficaz para êste fato. São fáceis de compreender as inúmeras ocasiões de infecção em trabalhos desta natureza, por mais rigorosas que sejam as precauções tomadas, em conseqüência da intensidade do trabalho com a constante manipulação de material muito virulento. Todos os funcionários ocupados nos trabalhos de febre maculosa são vacinados pelo menos cada seis meses, recebendo três inoculações de 2 cm^3 cada, por ocasião da vacinação semestral.

I — BIBLIOGRAFIA

1. *Piza, J. de Toledo, Gomes, F. Salles, Gomes, L. Salles, Meyer, J. R., Fleury, J. P., Castro, Oliveira, Rodrigues, C. & Lima, H. de Rocha* (1931). Le typhus exanthématique a São Paulo. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **106**, 1020-1022.
2. *Piza, J. de Toledo, Meyer, J. R. & Gomes, L. Salles* (1932). *Typho exanthematico de São Paulo*, 156 p. ilus. São Paulo.
3. *Lima, H. de Rocha* (1918). *Münch. med. Wschr.*, **65**, 454.
4. *Weigl, R.* (1930). Die Methoden der aktiven Fleckfieber-Immunisierung. *Bull. Acad. Polon. sci. med.*, 25.
5. *Weigl, R.* (1933). Faits d'observation et expériences démontrant l'efficacité du vaccin a rickettsia pour la prévention du typhus. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **22**, 315-320.
6. *Chodsko, W.* (1933). Expérience polonaise de la vaccination préventive contre le typhus exanthématique d'après la méthode de Weigl. *Off. internat. hyg. publ.*, **25**, 1549-1558.
7. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* (1925). Rocky Mountain spotted fever: vaccination of monkeys and man. *Publ. Health Rep.*, **40**, 2159-2167.
8. *Zinsser, H. & Batchelder, A. P.* (1930). Studies on Mexican typhus fever. I. *J. exp. Med.*, **51**, 847-858.



9. *Zinsser, H. & Castañeda, M. R.* (1933). Studies on typhus fever. X. Further experiments on active immunisation against typhus fever with killed Rickettsia. *J. exp. Med.*, 57, 291-390.

10. *Zinsser, H. & Castañeda, M. R.* (1931-32). A method of obtaining large amounts of *Rickettsia prowazeki* by X-ray radiation of rats. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, **29**, 840-844.

11. *Zinsser, H. & Macchiavello, A.* (1936-37). Enlarged tissue cultures of European typhus rickettsiae for vaccine production. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, **35**, 84-87.

12. *Zinsser, H., Wei, H. & Fitzpatrick, F.* (1937-38). Agar slant tissue cultures of typhus Rickettsiae (both types). *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, **37**, 604-606.

13. *Zinsser, H., Wei, H. & Fritzpatrick, F.* (1938). Nouvelles méthodes de culture de Rickettsiae du typhus 'a propos de la production de vaccins. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **127**, 229-232.

14. *Castañda, M. R.* (1939). Experimental pneumonia produced by typhus rickettsiae. *Amer. J. Path.*, **15**, 467-475.

15. *Cox, H. R.* (1938). Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing Rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever and typhus groups. *Publ. Health Rep.*, **53**, 2241-2247.

16. *Monteiro, J. Lemos* (1935-36). A vaccinação preventiva como base da prophylaxia do typho exanthematico de São Paulo. *Mem. Inst. Butantan*, **10**, 1-16.

17. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F.* (1932). Typho exanthematico de S. Paulo. XI. Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). *Mem. Inst. Butantan*, **7**, 33-50.

18. *Monteiro, J. Lemos, Fonseca, F. & Prado, A.* (1932). Typho endemico de São Paulo. VI. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus por Ixodidae. *Brasil-méd.*, **46**, 49-52.

19. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F.* (1933-34). Localização da *Rickettsia brasiliensis* nas cellulas dos diverticulos intestinaes do *Amblyomma cajennense*. *Mem. Inst. Butantan*, **8**, 49-56.

20. *Gomes, L. Salles* (1933). Typho exanthematico de São Paulo. *Brasil-méd.*, **47**, 923-926.

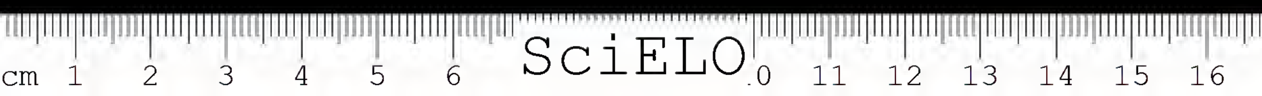
21. *Travassos, J.* (1938). Estudos experimentaes sobre a transmissão do tifo exantematico de São Paulo pelo *Amblyomma striatum* Koch, 1844. *Rev. biol. e hig.*, **9**, 64.

22. *Travassos, J.* (1938). Etudes expérimentales sur la transmission du typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma striatum* Koch, 1844. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **127**, 462-464.

23. *Travassos, J.* (1938). Transmissão experimental do virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas pelo *Amblyomma striatum* Koch, 1844. *Rev. biol. e hig.*, **9**, 69.

24. *Travassos, J.* (1938). Transmission expérimentale du typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **127**, 1375-1376.

25. *Travassos, J.* (1938). La tique *Amblyomma striatum* Koch, 1844, comme vecteur du typhus exanthématique de São Paulo. Infections naturelles en spécimens recueillis sur des chiens, dans un foyer de la capitale (São Paulo). *C. R. Soc. Biol., Paris*, **127**, 1377-1380.



26. *Travassos, J.* (1938). Possibilidade de infecção dos carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma striatum*, ao sugarem o cão inoculado com o virus do typho exanthematico de S. Paulo. *Rev. biol. e hig.*, 9, 72.

27. *Travassos, J.* (1938). Estudo da infecção ativa ou latente dos carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma striatum*, pelo virus do tifo exantematico de São Paulo Processos de reativação. *Rev. biol. e hig.*, 9, 64.

28. *Robinson, L. E.* (1908-26). The genus *Amblyomma*. Citado em *Nuttall, G. H. F., Warburton, C., Cooper, W. F. & Robinson, L. E.* (1908-26). *Ticks: a monograph of the Ixodoidea*, 6v. ilus. Cambridge, University press.

29. *Rondelli, M. T.* (1937). Ixodoidea. Parte I. *Amblyomma ovale* Koch, *Amblyomma cajennense* Fabricius e le specie a loro affini nuove o poco note. Spedizione del Prof. *Beccari* nella Guyana Inglese. *Riv. Parassit.*, 1, 273-300.

30. *Rohr, C. J.* (1909). *Estudos sobre Ixodidas do Brasil*, 220 p. 5 planchas. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz.

31. *Cooley, R. A. & Kohls, G. M.* (1944). The genus *Amblyomma* (*Ixodidae*) in the United States. *J. Parasit.*, 30, 77-111.

32. *Dias, E. & Martins, A. V.* (1938). A preparação da vaccina de Spencer e Parker contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas, no Rocky Mountain Laboratory, em Hamilton, Montana, Estados Unidos. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 13, 55-70.

33. *Monteiro, J. Lemos* (1933-34). Vaccina contra o typho exanthematico de S. Paulo. Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas. *Mem. Inst. Butantan*, 8, 9-20.

34. *Parker, R. R. & Spencer, R. R.* (1930). Studies on Rocky Mountain spotted fever. *Nat. Inst. Health Bull.*, 154, 1-1116.

35. *Parker, R. R.* (1941). Rocky Mountain spotted fever: results of fifteen years' prophylatic vaccination. *Amer. J. trop. Med.*, 21, 369-383.

36. *Piza, J. de Toledo* (1942). A vacina de Spencer-Parker contra a febre maculosa na prática sanitária. *Arq. de cir. clin. e exper.*, 6, 1329.

(Entregue para publicação em julho de 1944).




SciELO

SOBREVIDA DA PARELHEIRA (*PHILODRYAS*. SP.) DEPOIS DA ADRENALECTOMIA

POR

JOSÉ RIBEIRO DO VALLE

(*Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil*)

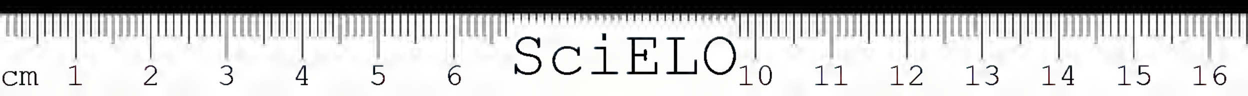
São bem conhecidos os efeitos da adrenalectomia nos mamíferos, principalmente no rato e no cão, mas embora o assunto tenha sido examinado também nas aves e nos anfíbios, até agora, ao que me parece, os reptis ainda não foram empregados como material de estudo neste particular.

A maior sobrevida do rato infantil adrenoprivo em dieta apropriada é de 10 dias. Segundo BÜLBRING (1), patos adrenoprivos sobrevivem em média apenas 11 horas. HERRICK e TORSTVEIT (2) operaram pintos Leghorn e a sobrevida dos adrenoprivos totais, sem tratamento substitutivo, foi de 15 a 16 horas. FUSTINONI (3) estudou bem o problema nos batráquios; a sobrevida dos sapos operados bilateralmente foi, em média, de 14 dias, sendo maior no inverno e menor no verão. Estes dados mostram o interêsse da observação do que poderia ocorrer nos ofídios. Pertenceriam êsses vertebrados, quanto ao tempo de sobrevida depois da ablação das adrenais, ao grupo das aves ou ao dos mamíferos e anfíbios?

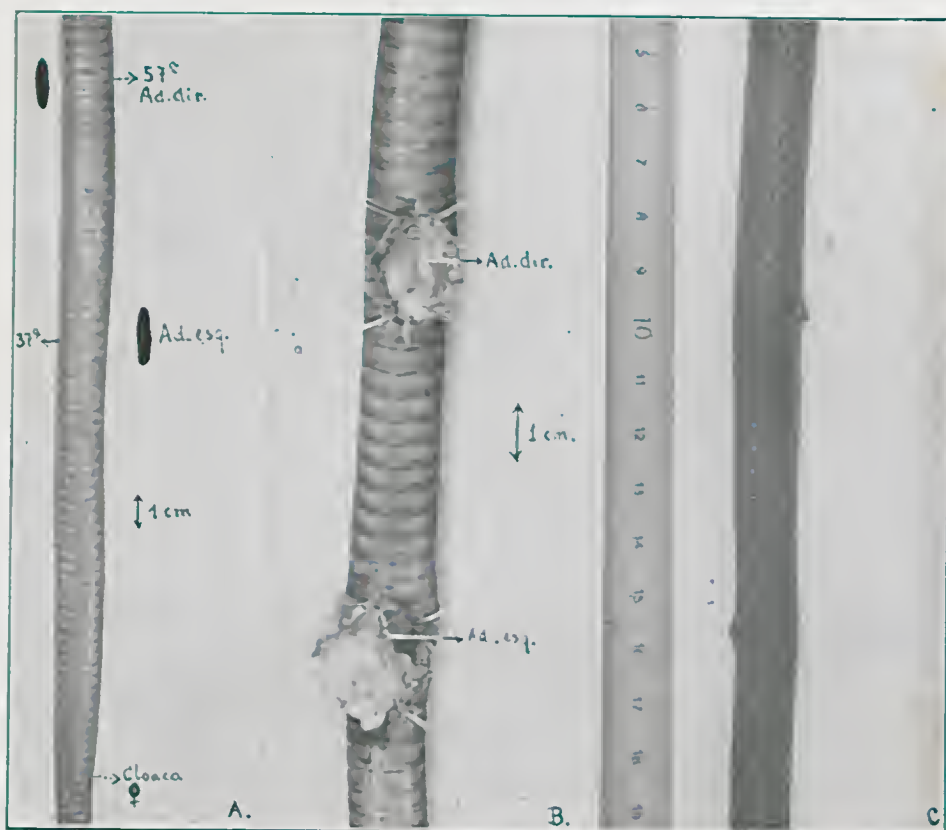
Nesta nota comunico os resultados observados depois da operação de 30 exemplares adultos de parelheiras (*Philodryas*. sp.) sendo 24 fêmeas e 6 machos, recém-chegados a êste Instituto e em condições aparentes de boa saúde. Empreguei essas colubrideas não peçonhentas, ao invés das crotalídeas, não só pela maior facilidade de manejo mas, sobretudo, porque aquelas possuem adrenais mais curtas e menos afiladas e por isso mais fàcilmente extirpáveis.

MÉTODO OPERATÓRIO

A anestesia é feita com éter, primeiro colocando o animal num recipiente de vidro contendo algodão prèviamente embebido no anestésico que depois, no decurso da intervenção, é ministrado por meio de uma pequena máscara afunilada de folha de Flandres. Uma vez sob narcose a serpente é distendida numa placa de cortiça e o nível das duas incisões látero-ventrais, uma superior para a adrenal



direita e a outra inferior para a adrenal esquerda, estabelecido graças à contagem das placas ventrais a partir da cloaca. (*)



Fotografias de uma Parelheira (*Phylodryas* sp.) fêmea.

A. Projeção cutânea das adrenais pela contagem das placas a partir da cloaca. A adrenal esquerda corresponde à zona delimitada pelas 35.ª e 39.ª e a direita pelas 55.ª e 59.ª placas ventrais. (Nos machos a adrenal direita fica mais distal, ao nível da 45.ª placa ventral).
B. Incisões ventrais para mostrar a localização glandular.
C. Aspecto das suturas látero-ventrais depois de terminada a adrenalectomia (vista dorsal).

Nos machos e nas fêmeas a projeção da adrenal esquerda corresponde à superfície cutânea delimitada pelas 35a. e 39a. placas ventrais, em geral ao nível da 37a. placa; a adrenal direita corresponde ao nível da 45a. para os machos e da 58a. placa ventral para as fêmeas. (Fig. 1 A).

(*) Êste processo de localização visceral nos ofídios pela contagem das placas ventrais e que não vi ainda descrito, deu bom resultado também na pancreatectomia de jararacas.

A assepsia é relativa. Incisão látero-ventral obliqua acompanhando a direção das costelas e separação das fibras musculares até a cavidade geral. A adrenal é identificável como um órgão esbranquiçado, alongado e próximo à gonada (Fig. 1 B). Exteriorizados a glândula, os vasos e tecidos adjacentes, isola-se com cuidado o órgão, ligam-se os pediculos anterior e posterior e suturam-se os ramúsculos venosos transversais que deixam a glândula para desembocarem ou na veia cava caudal (adrenal direita) ou na mesma veia cava ou na veia aferente renal (adrenal esquerda) (4).

Em alguns exemplares, as veias adrenais eferentes são curtas e, então, o órgão se apresenta muito acolado ao tronco venoso. Nestas condições, o isolamento e a extirpação glandulares, sem hemorragia, são bastante dificultados. De qualquer modo a veia cava e a veia eferente renal precisam ser poupadas. Os 2 ou 3 filetes arteriais, que irrigam a adrenal provenientes da aorta, ficam livres nas suas ramificações no processo de descolamento do tecido conjuntivo, não exigindo, por isso, ligadura particular. Repostos os órgãos na cavidade geral, faz-se a sutura com "cat-gut" do plano muscular e da pele (Fig. 1 C). Si a operação decorrer bem, as condições do animal no dia seguinte são satisfatórias.

Antes e depois da operação as parelheiras são mantidas em gaiolas teladas com vasilha de água e alguns camundongos para eventual alimentação espontânea.

Seguindo o método que ficou descrito foi feita a adrenalectomia unilateral em 12 e a bilateral em 18 parelheiras (*) como base para o estudo preliminar do assunto.

RESULTADOS

Nestas experiências cuidei apenas da questão técnica e da sobrevida dos animais operados, deixando para estudos ulteriores o problema do metabolismo do sódio e do potássio e a influência do tratamento pelo hormônio cortical.

Das 12 parelheiras adrenoprivas unilaterais, 5 sobreviveram mais de 20 dias e nas outras 7 a sobrevida média foi de 7 dias. Nas 18 parelheiras adrenoprivas totais, apenas 2 sobreviveram mais de 20 dias, respectivamente 32 e 45 dias, mas em ambas a autópsia mostrou restos glandulares suspeitos no local da operação. A sobrevida média das restantes foi também de 7 dias.

No grupo de adrenalectomizadas unilateralmente a maior sobrevida observada foi de 80 dias, sendo a mortalidade de 58% dentro dos 12 primeiros dias depois da intervenção. No grupo de adrenoprivas bilaterais a mortalidade em igual periodo foi de 83%. Si forem excluidas dêste último grupo as duas parelheiras nas quais eu observei, à autópsia, restos glandulares no local da operação, então a mortalidade dentro dos 12 primeiros dias sobe a 94%. Dentro de 20 dias seria de 100%.

(*) Agradeço ao meu antigo auxiliar Francisco Ribeiro Gomes a valiosa ajuda técnica prestada no decorrer dêste trabalho.



Diante dos resultados observados e à semelhança do que ocorre nos outros vertebrados, a adrenal dos ofidios é também indispensável à vida. O periodo de sobrevida das parelheiras adrenoprivas bilaterais parece em tôrno de 12 dias. Outras experiências, no entanto, se fazem necessárias para conclusão definitiva e melhor análise da questão abordada nesta nota. De qualquer modo, quanto ao tempo de sobrevida após a ablação das adrenais, os ofidios pertencem antes ao grupo dos mamiferos e anfibios, com sobrevida de alguns dias, do que ao grupo das aves com sobrevida apenas de algumas horas.

RESUMO

Nesta nota é descrito um método de adrenalectomia dos ofidios e registrado o periodo de sobrevida de 30 exemplares adultos de *Philodryas* sp. sendo 12 operados unilateralmente e 18 adrenoprivos bilaterais. A mortalidade dentro dos 12 primeiros dias depois da operação foi de 58% para o primeiro e de 83% para o segundo lote. Os ofidios, quanto ao tempo de sobrevida depois da ablação das adrenais, pertencem pois ao grupo dos mamiferos e dos anfibios e não ao grupo das aves.

ABSTRACT

A method of adrenalectomy in snakes, after localization of the glands by counting the ventral scales, is described and the survival time of 30 adult *Philodryas* sp., 12 unilaterally and 18 bilaterally operated, was observed.

The mortality in the control group was 58% within the first 12 days following the operation. After total adrenalectomy and within the same period, the mortality was 83%. Excluding 2 animals on account of fragments of adrenal tissue at the site of the operation, 100% of the bilaterally adrenalectomized snakes died within 20 days.

Ophidia belong therefore, as far as the survival time after adrenalectomy is concerned, not to birds but to mammalia and amphibia groups.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bülbring, E.* (1937). The standardization of cortical extracts by the use of drakes. *J. Physiol.*, **89**, 64-80.
2. *Herrick, E. H. & Torstveit, O.* (1938). Some effects of adrenalectomy in fowls. *Endocrinology*, **22**, 469-473.
3. *Fustinoni, O.* (1938). La supervivencia de los sapos suprarrenalectomizados. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **14**, 40-48.
4. *Junqueira, L. C. U.* (1944). Nota sôbre a morfologia das adrenais dos ofidios. *Rev. Bras. Biol.*, **4**, 63-67.

(Recebido para publicação em 20 de janeiro de 1945).

NOTA SÔBRE A HEMATOLOGIA DOS OFÍDIOS ÍNDICES DE WINTROBE DA *BOTHROPS JARARACA*

POR

J. R. VALLE & J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

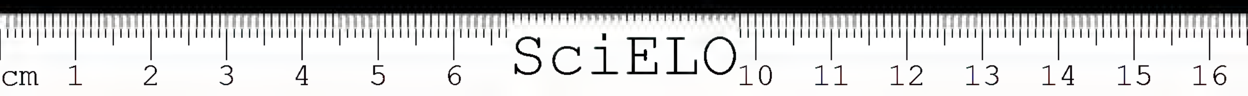
Em 1934, WINTROBE (1) determinou as variações de tamanho e o teor de hemoglobina dos eritrocitos de vários vertebrados partindo do número de glóbulos vermelhos por mm^3 de sangue, da taxa de hemoglobina em gramas por cento e da relação percentual plasmo-globular. Os valores, hoje conhecidos por índices de WINTROBE, expressam: 1.º) o volume médio da hematia em micra cúbicas chamado volume corpuscular médio (V.C.M.); 2.º) o teor de hemoglobina do eritrocito em micromicrogramas, ou hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) e 3.º) a concentração média percentual de hemoglobina em cada glóbulo vermelho ou concentração média de hemoglobina corpuscular (C.M.H.C.).

Dentre os ofídios, examinou aquele autor o sangue de 2 *Heterodon contortrix*, 2 *Eutania sirtalis* e 1 *Natrix sipedon*, encontrando de 500 a 1390 mil hematias por mm^3, 3.7 a 11.3 g % de hemoglobina, 13.3 a 37 % para a relação percentual plasmoglobular, 266 a 465 μ^3 para o V.C.M., 74 a 131 micromicrogramas para o teor de hemoglobina corpuscular e, finalmente, 28 a 31% para a concentração média de hemoglobina no glóbulo, sem a correção devida ao volume ocupado pelo núcleo.

No decurso de experiências usando serpentes colubrídeas e crotalídeas como material de estudo, tivemos ocasião de dosar a hemoglobina no sangue da jararaca e aproveitamos, então, a oportunidade para calcular aqueles índices e verificar si nestes vertebrados os valores encontrados apresentavam diferenças ligadas ao sexo.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregamos 26 exemplares adultos de *Bothrops jararaca*, 12 machos e 14 fêmeas, em condições de saúde aparentemente boas e recém-chegados ao serpentário do Instituto. Dentro dos primeiros 10 dias de permanência no Laboratório colhia-se o sangue por punção da aorta, acessível depois de incisão ventral na



união do terço médio com o terço posterior do animal. Não se empregou anestesia; a serpente era fixada com os devidos cuidados, distendida numa prancha de cortiça, e, depois da colheita, sacrificada por decapitação. O vaso era alçado por meio de um fio de linha e a agulha introduzida contra a corrente sanguínea. Colhiam-se de 2 a 3 cm^3 de sangue, que eram transportados imediatamente para um tubo de vidro contendo oxalato de potássio na diluição final, após conveniente agitação, de 0.2 g %.

Todos os exames foram feitos dentro dos tempos recomendados por OSGOOD, HASKINS & TROTMAN (2).

a) *Hematócrito.* Utilizamos segmentos de 10 cm de pipetas usadas de 0.1 ml. Aspira-se o sangue bem misturado até á altura aproximada de 7 cm e fecha-se o aparêlho com uma laçada de borracha flexível que obtura simultâneamente as duas extremidades. Depois de 45 minutos de centrifugação a 2500 r.p.m., a leitura é feita contra papel milimetrado e o resultado expresso em volume globular por cento.

b) *Hemoglobina.* A determinação de hemoglobina foi feita a partir da dosagem do ferro total em 1 ml de sangue pelo processo de PONDER (3) ligeiramente modificado.

c) *Contagem dos eritrocitos.* Foi feita a contagem em câmara de BUERKER com o sangue diluído a 1/200 ou 1/100 em solução de cloreto de sódio a 0.6 g%. A contagem era direta ou indireta em cópia microfotográfica do retículo, seguindo-se para isto, em linhas gerais, o processo descrito por LIDA & GOLBERG (4).

d) *Volume corpuscular médio.* Conhecidos o número de eritrocitos por mm^3 e a relação plasmo-globular é fácil calcular o volume eritrocítico médio.

e) *Hemoglobina corpuscular média.* O teor de hemoglobina em gramas por cento e o número de glóbulos vermelhos no mesmo volume de sangue são os dados para se calcular o teor médio de hemoglobina corpuscular.

f) *Concentração média percentual de hemoglobina corpuscular.* É encontrada multiplicando por 100 o teor de hemoglobina em gramas por cento e dividindo o produto pela relação plasmo-globular.

O grau de dispersão dos valores em tôrno da média e o êrro padrão foram calculados por meio das conhecidas fórmulas $\sigma = \sqrt{\Sigma d^2/_{n-1}}$ e $E = \sigma/\sqrt{_{n-1}}$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos vêm sumariados na Tabela I e referidos conforme o sexo dos exemplares examinados. Na última coluna horizontal figuram os valores médios gerais e o grau de dispersão de cada um. A média geral para a relação

TABELA 1

Sexo	Número	Pêso em gramas	Hematócrito %	Hemoglobina gramas %	Gl. vermelhos (milhares) por mm³	V. corp. médio μ^3	Hb. corp. média γγ	C.M.Hb.C. %
♂	3	255	25	7.4	550	454	135	30
	4	185	27	7.2	575	470	125	27
	9	160	20	5.3	315	635	168	26
	10	145	24	7.9	430	558	184	33
	18	167	31	12.1	825	376	147	39
	24	100	26	9.3	800	325	116	36
	25	132	24	7.5	615	390	122	31
	26	115	18	6.2	550	327	113	34
	27	110	20	5.9	500	400	118	29
	28	118	32	9.7	800	400	121	30
	29	135	27	8.4	665	406	126	31
	30	118	31	9.9	650	477	152	32
n=12	m	145	25	8.1	606	434	135	31
	σ σ	± 43	± 4.6	± 1.9	± 155	± 91	± 22	± 3.6
♀	1	380	30	9.4	575	522	163	31
	6	445	30	9.0	550	545	164	30
	7	144	24	9.0	400	600	225	37
	8	200	29	8.8	650	446	135	30
	11	170	28	7.0	550	509	127	25
	12	175	27	9.2	625	432	147	34
	13	175	27	8.9	550	491	162	33
	14	355	19	5.8	390	487	149	30
	15	370	19	5.2	400	467	130	28
	16	190	21	7.2	575	357	125	34
	19	140	19	6.7	600	311	112	35
	20	180	27	8.0	590	458	136	30
	22	300	18	5.7	435	414	131	32
	23	490	22	7.4	540	408	137	34
n=14	m	265	24	7.7	530	460	145	31
	σ σ	± 120	± 4.5	± 1.4	± 88	± 75	± 28	± 3.2
♂ e ♀	M	209	24	7.9	566	449	141	32
N=26	σ σ	± 116	± 4.6	± 1.7	± 128	± 86	± 25	± 3.3

plasmo-globular foi de 24% com um desvio de ± 4.6%. O teor de hemoglobina variou de 5.2 a 12.1 gramas %, sendo a média e o desvio de 7.9 ± 1.7 g %. O número de glóbulos vermelhos nos dois sexos variou de 315 a 825 mil, sendo a média e o desvio de 566 ± 128 mil eritrocitos por mm^3 de sangue.

Os valores para os índices de WINTROBE foram: volume corpuscular médio, de 311 a 635 μ^3, média 449 ± 86 μ^3; hemoglobina corpuscular média, de 112 a 225γγ, média 141 ± 25γγ; e concentração média de hemoglobina corpuscular de 26 a 39%, média 32 ± 3.3%.

COMENTÁRIOS

Para facilidade de comparação damos na Tabela II as médias dos valores encontrados por WINTROBE nos 5 exemplares de ofídios que estudou e aquelas que obtivemos nas 26 jararacas examinadas.

TABELA 2

GRUPOS	Hematócrito %	Hemoglobina g %	Gl. vermelhos (milhares) por mm^3	V.C.M. μ^3	H.C.M. γγ	C.M.H.C.* %
Valores médios segundo os dados de Wintrobe	25.8	7.7	800	330	98	30
Valores médios encontrados para a *Bothrops jararaca*	24.0	7.9	566	449	141	32

* Sem a correção devida ao volume do nucleo.

As médias que mais se afastam são as relativas ao número de glóbulos vermelhos, ao volume corpuscular médio e á hemoglobina corpuscular média; as duas últimas, conseqüentes da primeira. Em experiências anteriores, LEAL PRADO e MILLER DE PAIVA (5) fizeram contagens de eritrocitos no sangue de 25 jararacas e de 10 parelheiras (*Philodryas* sp.) encontrando os extremos de 240 e 965 e a média de 516 mil glóbulos vermelhos por mm^3, com um desvio padrão de 188 mil. Embora examinando exemplares de duas familias distintas — crotalideas e colubrídeas — a média referida é mais próxima da encontrada no presente estudo do que da calculada a partir dos dados de WINTROBE.

A dosagem de hemoglobina feita de maneira sistemática, ao que nos consta, pela primeira vez nestes vertebrados, dado o interêsse das observações registradas, constituirá trabalho a parte de um de nós.

Quanto à diferença das médias conforme o sexo vemos na Tabela I que ela è apreciável sómente em relação ao pêso dos animais. A média ponderal dos machos é bem inferior á registrada para as fêmeas e a aplicação da conhecida fórmula $m\text{-}m'/\sqrt{E^2 + E'^2}$ deu o resultado 3.4 que mostrou ser a diferença estatisticamente significativa. O mesmo não acontece, porém, com os demais elementos da tabela. Em outras palavras, os valores e os indices registrados não são significativamente diferentes conforme o sexo dos animais examinados.

Mensurações preliminares, pelo processo da ocular micrométrica, em esfregaços corados pelo Leishman, de sangue de jararacas e parelheiras, deram para as hematias elipticas e nucleadas dêstes ofidios, as médias de 20 e 11 μ respectivamente para o maior e o menor diâmetros. A superfície de uma face do glóbulo, admitindo-se com Wintrobe que o eritrocito seja um pequeno cilindro, será de $172\mu^2$ e a espessura, dividindo o volume corpuscular médio de 449 μ^3 pela superfície, de 2.6 μ.

Medindo o maior e o menor diâmetros do núcleo, considerada a sua espessura igual á do glóbulo, poude Wintrobe determinar o volume nuclear e deduzí-lo do volume globular, para então calcular a verdadeira concentração média de hemoglobina corpuscular. Si empregarmos a correção média de + 5%, usada por Wintrobe nos ofidios que examinou, teremos para a C.M.H.C. na jararaca o valor de 37%. Como ficou bem assinalado pelo autor norte-americano, embora os valores e os indices hematológicos variem muito entre os vertebrados, a concentração média de hemoglobina corpuscular é muito constante desde *Cyclostomata* até *Mammalia*, inclusive na sub-ordem *Ophidia* estudada no presente trabalho com maior casuistica.

É claro que os valores numéricos mencionados têm mero caráter aproximativo, representando, no entanto, os primeiros dados para o estudo da hematologia, inclusive das propriedades da hemoglobina, e a compreensão da fisiologia da respiração em tão importante grupo zoológico.

RESUMO

O sangue da *Bothrops jararaca*, examinado em 26 exemplares adultos, 12 ♂ e 14 ♀, contém, em média, 566 mil hematias por mm^3 e 7.9 gramas de hemoglobina por cento. O volume globular em relação ao plasmático é de 24%. O volume médio de um eritrocito, a hemoglobina corpuscular média e a concentração média de hemoglobina corpuscular são, respectivamente, 449 micra cúbicas, 141 micromicrogramas e 32%.

Não se registrou diferença estatisticamente significativa nestes valores, conforme o sexo dos animais examinados.

ABSTRACT

Hematological data of *Bothrops jararaca*

The blood of 26 *B. jararaca*, 12 males and 14 females, was examined. Red blood cells counts, hemoglobin concentration and hematocrit values were determined and from these data, according to WINTROBE, the mean corpuscular volume (C.V.) in cubic microns, the mean corpuscular hemoglobin (C.H.) in micromicrograms and the mean corpuscular hemoglobin concentration (C.C.) in percent, were calculated.

The results are summarized in the table below, where the mean and the standard deviation are given.

Groups	Average body weight g	Hemotocrit %	Hemoglobin g %	R.B.C. thousand/mm³	C.V. μ^3	C.H. $\gamma\gamma$	C.C. (*) %
12 ♂	145 ± 43	25 ± 4.6	8.1 ± 1.9	606 ± 155	434 ± 91	135 ± 22	31 ± 3.5
14 ♀	265 ± 120	24 ± 4.5	7.7 ± 1.4	530 ± 88	460 ± 75	145 ± 28	31 ± 3.2
26 ♂ ♀	209 ± 116	24 ± 4.6	7.9 ± 1.7	566 ± 128	449 ± 86	141 ± 25	32 ± 3.3

(*) Withouth nuclear correction.

Although a statistical significant difference has been observed for the body weight depending on the sex, there is not such a correlation in regard to the hematological data here presented.

BIBLIOGRAFIA

1. *Wintrobe, M. M.* (1934). Variations in size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematol.*, 51, 32-50.
2. *Osgood, E. E., Haskins, H. D. & Trotman, F. E.* (1931). Uniform system of hematologic methods for use with oxalated venous blood. *J. Lab. clin. Med.*, 16, 476-481.
3. *Ponder, E.* (1942). Relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration. *J. biol. Chem.*, 144, 333-338.
4. *Lida, E. & Goldberg, I.* (1940). Recuento de eritrocitos por la fotomicrografia. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 16, 523-527.
5. *Leal Prado & Miller de Paiva.* (1944). Nota sôbre a hematologia dos ofídios. Com. à Soc. Biol. de S. Paulo, sessão de 8 de maio.

(Recebido para publicação em 14 de outubro de 1944).

A NOTE ON THE ADRENIN CONTENT OF THE ADRENALS OF SNAKES

BY

J. R. VALLE & A. PORTO

(Department of Endocrinology of Instituto Butantan)

Preliminary studies have been reported on the morphology of the adrenals of (1) as well as on the survival period after adrenalectomy in the reptilia (2).

This note deals with the approximate adrenin content of the same organs of the *Bothrops jararaca*, as determined biologically.

METHODS

1) *Preparation of Extracts*: Immediately after decapitation of 10 to 12 healthy, adults, weighing from 160 to 340 g. the adrenals were removed, cleaned from connecting tissue and weighed on a torsion balance. Approximatelly 1 g of fresh glands are so secured. The, in a mortar ground glands, are then extracted with 0.1 N HCl (1 ml/100 mg of glands) and filtered. The filtrate neutralized with 10% sodium acetate to congo red indicator. Heated for 5 minutes and filtered hot. The filtrate may be adjusted by dilution with distilled water to a 1% solution, i.e., the equivalent extract of 10 mg per ml. Control extracts of ovaries and liver of the same snakes were prepared essentially by the same known method of Folin et al. (3).

Concentrated and diluted extracts have been used for the assay.

2) *Biological assay*: The pressor activity of the extracts was assayed in dogs with complete abolition of all central nervous functions. This is obtained according to the method of Galvão and Pereira (4) by injecting in the "cisterna magna", under 50 cm Hg pressure, a 20% sodium chloride solution. Artificial respiration and heating are used. The carotid artery is connected by rubber tubing to a Hg manometer and the extracts injected into the femoral vein.

The action of the extracts upon the smooth musculature "in vitro" was studied with duodenal strips and uterine horns of adult rats. The smooth muscles were immersed in 50 ml of oxygenated Ringer-Locke solution, at 38°C. and their longitudinal contractions registered in the usual manner.



In both instances, for the pressor activity in dogs and the inhibitory effect in rats, we tested also a known solution of adrenaline (*) as a basis for the approximate quantitative bio-assay of the mentioned extracts.

RESULTS

The diluted extracts of the ophidian adrenals, injected intravenously, rose the blood pressure of dogs in all the experiments performed. The intensity and the duration of the effect were proportional to the amount administered (Fig. 1, A and C). In one instance the increase of the carotidean pressure, following the injection of 1 ml = 2 mg of adrenals, was as high as that induced by a dosis of 5 γ of adrenaline (Fig. 1, C and E). This means, therefore, a hormonal concentration of 2.5 mg of adrenaline per gram of fresh tissue. However, in another test, a low concentration of 0.5 mg/g was obtained. None reaction followed the administration of the control extracts (see Fig. 1, B).

An example of the inhibitory action of the extracts of adrenals of snakes upon the intestinal and uterine contractions is shown in fig. 2, A and B. A dosis of 0.5 ml = 10 mg of an adrenal extract causes a fall of the duodenal tonus as strong as that of 50 γ of adrenaline (Fig. 2, A.). This is equivalent concentration of 5 mg of adrenaline per gram of adrenal gland. We prefer, however, as more reliable, the approximate content determined by the dog method.

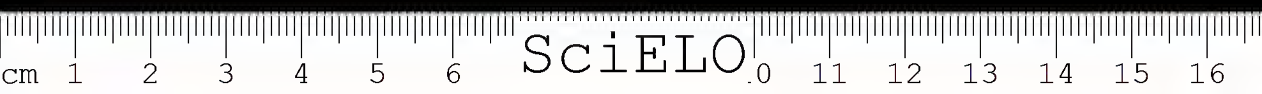
Studies concerning the adrenin content of adrenals of mammals have been summarized by Bomskov (5). The average vallues reported are from 0.2 to 4.2 mg of adrenin per gram of adrenal tissue. As the values above mentioned for the ophidian adrenals varied from 0.5 to 2.5 mg/g, it seems that the approximate adrenin concentration in adrenals of snakes can be compared with those data for mammals.

CONCLUSION

Extracts of adrenals of *Bothrops jararaca* increased the blood pressure of dogs with complete abolition of the central nervous activities and inhibited the spontaneous contractions "in vitro" of duodenal and uterine strips of rats. These peripheric actions, analogous to those observed after a known adrenaline solution, were not obtained with control extracts of ovaries and liver of the same donors.

The approximate adrenin content of the adrenals of those ophidia was found to be 0.5 to 2.5 mg/g. This adrenin concentration in snake's adrenals does not seem to be inferior to the known values for the same organs of mammals.

(*) Adrenaline hydrochloride, Parke Davis & Co.



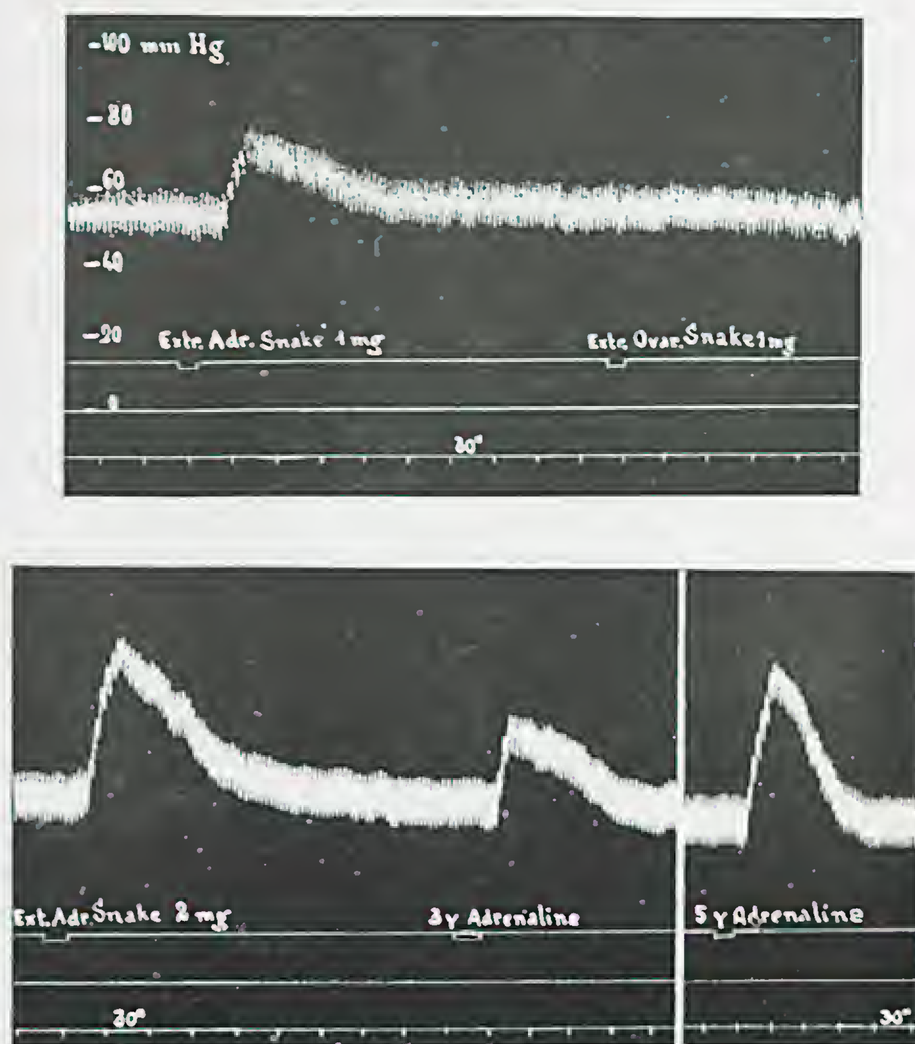


FIG. 1

Dog, 18 kg. Complete abolition of the central nervous activities following the cisternal injection of 20% sodium chloride under 50 cm Hg (Time intervals 30").

A. 1 ml = 1 mg of an adrenal extract of *B. jararaca*, effective.
B. 1 ml = 1 mg of an ovarian extract of *B. jararaca*, ineffective.
C. 2 ml = 2 mg of the same adrenal extracts as in A.
D. and E. 3 γ and 5 γ of adrenaline hydrochloride.

Note the comparable responses in A and D, C and E.

RESUMO

Extratos de adrenais de jararacas adultas, de ambos os sexos e sacrificadas por decapitação, elevam a pressão arterial do cão, com o sistema nervoso central destruido conforme a técnica de GALVÃO e PEREIRA, e inibem as contrações espon-

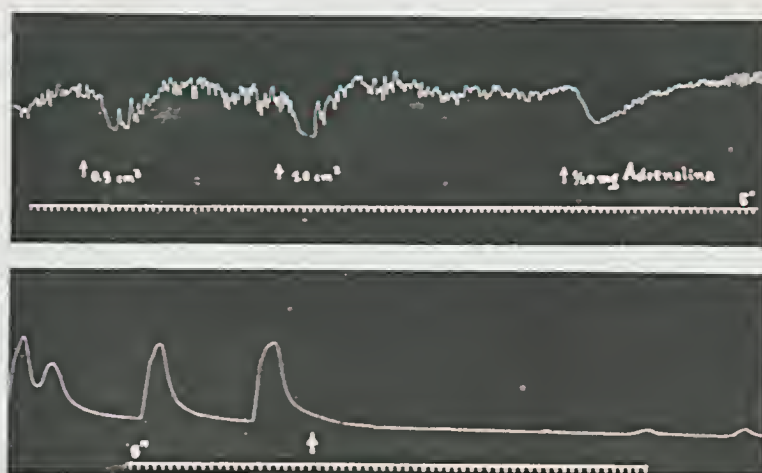


Fig. 2

Longitudinal spontaneous contractions "in vitro" of duodenum and uterus of an adult rat. (Time intervals 5").

A. Inhibition and fall of tonus of the duodenum following the addition to the nutritive bath of 0.5 ml = 10 mg. 1 ml = 20 mg of an adrenal extract of *B. jararaca* and of 50 γ of adrenaline hydrochloride.

B. Inhibition of the uterine contractions with 0.5 ml = 10 mg of the same adrenal extract as in A.

tâneas, "in vitro", do duodeno e do útero do rato. Estes efeitos periféricos, não observados com extratos testemunhas de ovário ou de fígado dos mesmos doadores, foram comparáveis aos obtidos com uma solução de cloridrato de adrenalina.

O teor das adrenais dos ofídios em adrenalina seria de 0.5 a 2.5 mg por grama de glândula fresca. Esta concentração não parece, pois, inferior àquela referida por diferentes autores para os mesmos órgãos de mamíferos.

REFERENCES

1. *Junqueira, L. C. U.* (1944). Nota sôbre a morfologia das adrenais dos ofídios. *Rev. Bras. Biologia*, **4**, 63-67.
2. *Valle, J. R.* (1945). Sobrevida da parelheira (*Philodryas* sp) depois da adrenalectomia. *Memórias do Instituto Butantan, in press.*
3. *Folin, O., Cannon, W. B. & Denis, W.* (1913). A new colorimetric method for the determination of epinephrine. *J. Biol. Chem.*, **13**, 477-483.
4. *Galvão, P. E. & Pereira, J.* (1942). Estudo das condições para a completa destruição de todo o sistema nervoso central nos mamíferos. *Arq. Inst. Biológico São Paulo*, **13**, 1-8.
5. *Bomskov, C.* (1939). Methodik der Hormonforschung. *Georg Thieme, Leipzig.*, Vol. 1, pp. 592-595.

(Received for publication in January, 1945).

NOTAS SÔBRE ALGUMAS DIFERENÇAS SEXUAIS NA FOLIDOSE DE *BOTHROPS ALTERNATA* D. & B., 1854, E SUA VARIAÇÃO GEOGRÁFICA. (*)

POR

P. E. VANZOLINI e J. H. FERREIRA BRANDÃO

(Do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Representam estas notas os primeiros resultados obtidos no decurso de pesquisas sôbre as variações da folidose na Urutú *(B. alternata)*, visando estabelecer de modo preciso esta face da questão do dimorfismo sexual, bem como lançar alguma luz sôbre a sua importância na solução do problema mais árduo da especiação.

Em cuidadosa revisão da espécie *Bothrops alternata*, dá AMARAL (1934) grande ênfase às variações da folidose, contrapondo-as fortemente à diferenciação geográfica, segundo se depreende dos seguintes trechos do seu trabalho (pg. 172):

"A observação atenta dêsse Quadro I, particularizada aos indivíduos de cada sexo dentro da mesma distribuição geográfica, dá margem às seguintes indicações:

1a. as variações da folidose são mais acentuadas entre os indivíduos de sexo oposto na mesma localidade do que entre os do mesmo sexo em localidades diversas;

2a. não existe, por conseguinte, relação, pelo menos aparente, entre a distribuição geográfica e as variações da folidose nos exemplares, do mesmo sexo, de *Bothrops alternata*."

E mais adiante:

(*) Desejamos consignar aqui os nossos agradecimentos ao Prof. FLAVIO DA FONSECA, chefe da Seção de Parasitologia do Instituto Butantan, onde foi realizado o presente trabalho; ao Dr. AFRANIO DO AMARAL, pelo auxílio de sua valiosa experiência e cessão de dados bibliográficos; ao Dr. CLEMENTE PEREIRA, do Instituto Biológico, a quem devemos inestimável orientação, apôio e encorajamento e, finalmente, ao Prof. OTTO BIER, atual Diretor do Instituto Butantan, pelas facilidades de trabalho e estímulo que nos proporcionou.

TABELA 1

Dorsais

Am.	♀♀ M	♀♀ s^2	♀♀ n'	♂♂ M	♂♂ s^2	♂♂ n'	d	t	P	e^{2z}	P
P	29,697 ± 0,345	1,403	33	28,222 ± 0,257	1,387	27	1,475	4,728	0,001	—	—
aP	29,450 ± 0,371	1,378	10	28,429 ± 0,570	2,285	7	0,971	1,297	0,2	1,658	0,05
pP	28,571 ± 0,254	0,905	14	26,538 ± 0,220	0,629	13	2,033	5,792	0,001	—	—
MG	31,667 ± 0,345	1,424	12	28,500 ± 0,500	1,500	6	3,167	4,964	0,001	—	—
C	32,100 ± 0,528	2,786	10	30,750 ± 0,754	4,544	8	1,350	1,364	0,2	1 631	0,05
oRG	33,308 ± 0,346	1,564	13	29,167 ± 0,749	3,267	6	4,141	5,434	0,001	2,153	0,05

TABELA 2

Ventrais

Am.	♀♀ M	♀♀ s^2	♀♀ n'	♂♂ M	♂♂ s^2	♂♂ n'	d	t	P	e^{2z}	P
P	174,121 ± 0,569	10,686	33	168,778 ± 0,666	11,948	27	5,343	5,037	0,001	—	—
aP	175,000 ± 0,35	10,711	10	169,714 ± 1,123	8,905	7	5,286	3,192	0,01	—	—
pP	179,714 ± 0,944	12,484	14	174,846 ± 0,898	10,474	13	4,868	3,585	0,001	—	--
MG	174,667 ± 0,932	10,424	12	175,337 ± 1,600	15,367	6	0 700	0,352	0,7	1,474	0,05
C	172,500 ± 1,284	16,500	10	168,375 ± 1,031	8,554	8	4,125	2,276	0,04	1,929	0,05
oRG	178,385 ± 1,035	13 928	13	171,000 ± 1,438	12,400	6	7,385	4,082	0,001	—	—

TABELA 3

Sub-caudais

Am.	♀♀ M	♀♀ s^2	♀♀ n'	♂♂ M	♂♂ s^2	♂♂ n'	d	t	P	e^{2z}	P
P	36,219 ± 0,526	8,868	32	43,615 ± 0,109	3,126	26	7,396	11,155	0,001	2,537	0,01
aP	36,444 ± 1,042	9,778	9	44,286 ± 0,685	3,238	7	7,842	5,534	0,001	3,020	0,05
pP	39,643 ± 0,685	6,555	14	47,846 ± 0,517	3,474	13	8,203	9,004	0,001	1,587	0,05
MG	35,200 ± 0,605	4,386	12	44,000 ± 0,856	4,400	6	8,750	7,955	0,001	--	—
C	36,333 ± 0,726	4,750	9	44,375 ± 0,532	2,268	8	8,042	8,215	0,001	2,094	0,05
oRG	38,308 ± 0,581	4 397	13	44,833 ± 1,138	7,767	6	6,525	5,353	0,001	1,766	0,05

"O exame conjunto dêsse Quadro II com o Quadro I fornece mais estas indicações:

1a. as escamas dorsais variam de 27 a 31 (excepcionalmente 32 ou 33) nos ♂♂ e de 29 a 33 (excepcionalmente 27 a 35) nas ♀♀;

2a. os escudos ventrais variam de 165 a 177 (excepcionalmente 161 a 183) nos ♂♂ e de 170 a 183 (excepcionalmente 164 a 185) nas ♀♀;

3a. os pares de escudos subcaudais variam de 40 a 49 (excepcionalmente 38 a 50) nos ♂♂ e de 33 a 40 (excepcionalmente 31 a 44) nas ♀♀."

Desde que a análise estatística dêsses mesmos dados de AMARAL, feita à luz da Nova Sistemática, nos levara a conclusões um tanto diversas, inclinando-nos a dar grande pêso à variação geográfica, resolvemos encarar êste problema do dimorfismo sexual na folidose de *B. alternata* dentro de amostras o mais homogêneas possível, afastando assim, em nossa análise, a influência da diferenciação geográfica.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos os dados publicados por AMARAL (e que julgamos desnecessário rever), completados tanto quanto possível por observações próprias. O material foi distribuido em amostras, seguindo um critério que teremos ocasião de discutir, com mais pormenores, em trabalho futuro. Por enquanto diremos que, depois de reunidos os exemplares segundo as características biogeográficas da sua região de origem (isto é, considerando além da proximidade geográfica, a semelhança de aspectos ecológicos) verificamos a propriedade dêsse agrupamento, tendo como base de comparação uma série de exemplares (amostra aP) de proveniência única (Araucaria, Est. do Paraná).

Consideramos, no presente trabalho, apenas aquelas amostras que nos parecem indubitàvelmente homogêneas à luz dos nossos resultados atuais. Constam elas de um total de 142 exemplares, assim distribuidos.

Amostra P — 33 fêmeas e 27 machos provenientes da zona leste do Estado do Paraná (Araucaria, Balsa Nova, Campo Largo, Carambei, Curitiba, Entre Rios, Fernandes Pinheiro, Lapa, Palmeira, Ponte Grossa, Porto Amazonas, Rio da Várzea, São José do Pinhais).

Amostra aP — 10 fêmeas e 7 machos de Araucária, Est. do Paraná (considerados também na amostra anterior).

Amostra pP — Uma ninhada de 27 filhotes (13 machos e 14 fêmeas) de Palmeira, Est. do Paraná, não incluidos na amostra P.

Amostra MG — 12 fêmeas e 6 machos do sul do Est. de Minas Gerais — (Alfenas, Campanha, Carmo da Cachoeira, Caxambú, Fama, Lambarí, Nogueira, Três Pontas).



Amostra C — 10 fêmeas e 8 machos provenientes de Americana, Araras, Cordeiro, Cosmópolis, Desembargador Furtado, Engenheiro Coelho, José Paulino, Leme, Martim Francisco, Mogi Mirim, Remanso e Ressaca.

Amostra oRG — 13 fêmeas e 6 machos da zona oeste do Est. do Rio Grande do Sul — (Alegrete, Canabarro, Itaqui, João Arreguí, Rosário, Saican, São Simão, Tigre, Tupari e Uruguaiana).

O estudo conjunto das amostras *P*, *aP* e *pP*, se revela muito interessante, sobretudo no que diz respeito à variabilidade, pois inclui a amostra P, pertencente a uma zona das mais homogêneas fisiogeogràficamente, a amostra aP contendo exemplares de proveniência única e a amostra pP que se refere a uma ninhada onde, por sinal, a razão sexual é de 1:1.

Quanto aos métodos estatísticos empregados foram o test de *t* (*Student*) para diferenças entre médias de pequenas amostras e o test de *z* (por intermédio de tábuas de e^{2z}) para as comparações de varianças.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão consignados nas tabelas 1, 2 e 3 e nos correspondentes gráficos. As tabelas não requerem maiores explicações: convém apenas esclarecer que o valor de P não é o valor exato, mas o valor correspondente ao *t* tabulado mais próximo ao obtido.

Nos gráficos, comparamos as amplitudes teóricas das distribuições ($M \pm 3s$) e os limites fiduciais da médias ($M \pm 3s_m$).

DISCUSSÃO

N.º de fileiras de escamas dorsais — Considerando inicialmente as amostras *P*, *pP*, e *aP*, verificamos que, enquanto *t* atinge alto nível de significação para as duas primeiras, para a amostra *aP* apresenta um valor de 0,2, isto é, insignificante. A causa disso parece residir na variança muito elevada dos machos. Com efeito, enquanto para as amostras *P* e *pP* temos e^{2z} igual respectivamente a 1,012 e 1,439, na amostra *aP* temos e^{2z} igual a 1,658, sendo a variança dos machos a maior. Veremos, na análise das ventrais, que, também aqui, *t* para esta amostra, se bem que significante, é menor que nas duas outras. Com as subcaudais, notamos a mesma coisa. Aliás, mesmo que isso se verificasse apenas com uma das variáveis em questão, isso em nada diminuiria a importância do fato, pois as correlações calculadas entre elas não são significativas.

Uma hipótese para explicar êste comportamento anormal da amostra *aP* é a de que existam nela indivíduos provenientes da mesma ninhada. Comparando

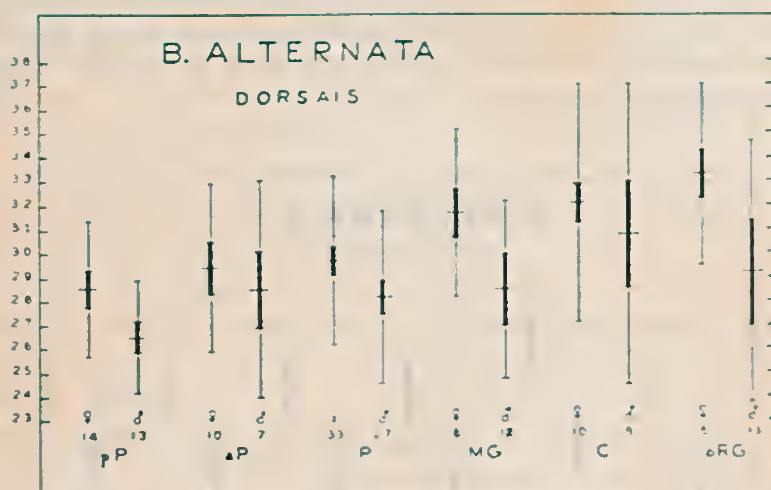


FIG. 1 — Filas de escamas dorsais. Comparação das amostras; para cada uma estão indicados a média e os pontos ± 3 S e (± 3 S_m) bem como o número de exemplares.

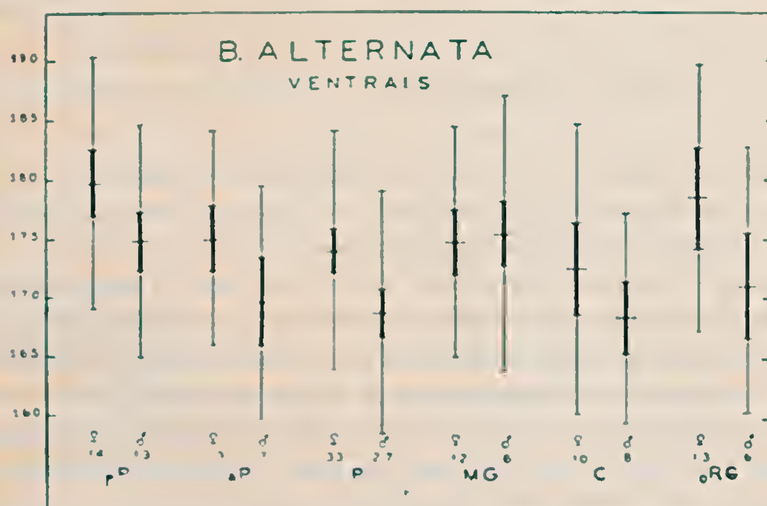


FIG. 2 — Escudos ventrais. Mesmos dados que a fig. 1.

as médias das amostras *P* e *pP*, vemos o forte afastamento entre elas, não obstante a amostra *pP* ser composta de filhotes de uma cobra proveniente da região P. Compreende-se assim que, numa amostra pequena, a existência de indivíduos

provenientes de uma mesma ninhada possa trazer distorções. Êste, contudo, é um ponto que só poderá ser elucidado com observação de mais material.

Das outras amostras, a *MG* e a *oRG* apresentam valores de *t* de alto nivel de significação, notando-se de passagem que as suas médias de fêmeas são mais altas que as das amostras anteriormente consideradas (Est. do Paraná) enquanto os machos mantêm valores próximos.

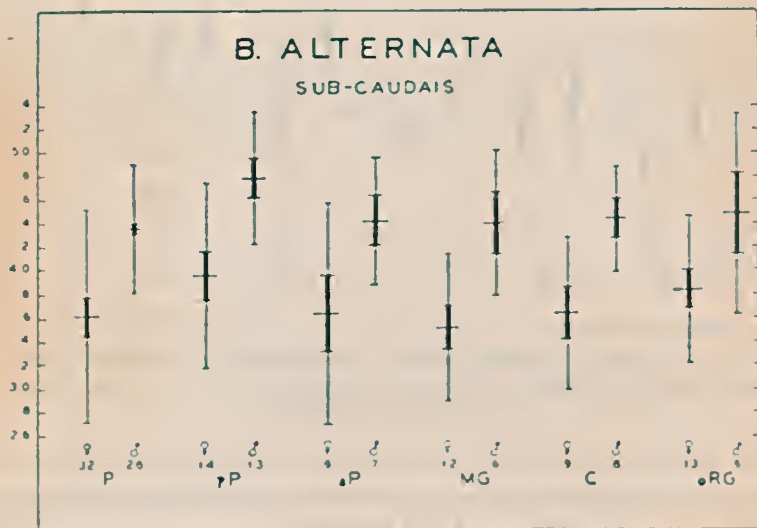


Fig. 3 — Escudos sub-caudais. Mesmos dados que as figs. precedentes.

Já para a amostra *C*, *t* não se apresenta significante, em vista dos altos valores apresentados pelos machos, os quais, além disto, possuem variança notàvelmente elevada. Este fato é de grande importância, mormente se considerarmos a posição geográfica da região. Com efeito, ela se situa entre o planalto paulista e a Serra da Mantiqueira, que a separa da região MG. Por outro lado, se liga à região centro-norte do Est. de S. Paulo, a cujo respeito, apesar do material relativamente abundante, não conseguimos ainda formar uma idéia sólida. Por outro lado, esta amostra fica no caminho natural entre as regiões supracitadas e a região centro-sul do Est. de São Paulo, da qual a separa o vale do Rio Tietê. Esta última região (centro-sul) se intergrada com o Estado do Paraná: dela, porém, sòmente possuimos material escasso.

No. de escudos ventrais — Notamos altos valores de *t* para as amostras *P*, *aP* e *pP*, valendo aqui o que observamos com relação às dorsais. A amostra *oRG* também apresenta valores significantes, e no mesmo sentido.

Aqui de novo deparamos com um fato interessante relacionado com a amostra *C*. A diferença entre médias de machos e fêmeas se acha próxima do limiar de significação; as fêmeas apresentam valores baixos e uma variança relativamente elevada, se bem que, aqui como nas outras amostras, o pequeno número de observações prejudique bastante o test de comparação de varianças.

Finalmente, a amostra *MG* apresenta um valor baixíssimo para *t*. Ora, valores como se veem nesta amostra para machos e fêmeas se veem também nas outras. Mas, valores como êsses nos dois sexos foram encontrados apenas nesta amostra. Além disto, os machos se apresentam com variança maior, embora seu pequeno número não permita conclusões sólidas.

N.º de pares de escudos subcaudais — Todas as diferenças sexuais com referência às subcaudais são significantes; *t* apresenta aqui valores elevadíssimos. Mas, além dêsse, outro aspecto interessantissimo apresentam estas distribuições a questão das varianças.

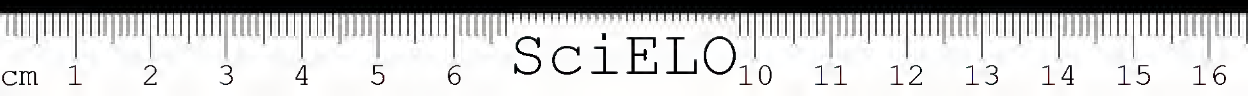
Para a amostra *P* as fêmeas são significantemente mais variáveis. Para a amostra *aP*, e^{2z} se aproxima do nível de significação. No entanto, se consideramos que os valores de tais varianças, baseadas em poucos graus de liberdade, não diferem sensivelmente dos da amostra *P*, baseados em 31 e 25 graus de liberdade, podemos considerar êste resultado da amostra *aP* como significativo. Já com a amostra *pP* não podemos dizer o mesmo; é necessário ter mais cautela. Assim, qualquer conclusão nesse sentido fica dependendo de maior acúmulo de material.

A amostra *MG* não apresenta praticamente diferença nenhuma; mas a amostra C apresenta uma diferença a favor das fêmeas, e a *oRG*, a favor dos machos. Êstes também são fatos que, por enquanto não permitem conclusões alguma, desde que se baseiam em poucos indivíduos.

CONCLUSÕES

1. *Bothrops alternata* DUMÉRIL et BIBRON, 1854, apresenta marcado dimorfismo sexual no que diz respeito à folidose, especialmente nítido quanto ao número de pares de escudos subcaudais, se bem que também significativo quanto aos escudos ventrais e fileiras de escamas dorsais [S] (vide as tabelas e os gráficos para os dados exatos).

2. A diferenciação geográfica desempenha importantíssimo papel no estabelecimento de tal dimorfismo sexual; o estudo das particularidades dêste é talvez de grande importância para a elucidação de problemas relativos à especiação.



SUMÁRIO

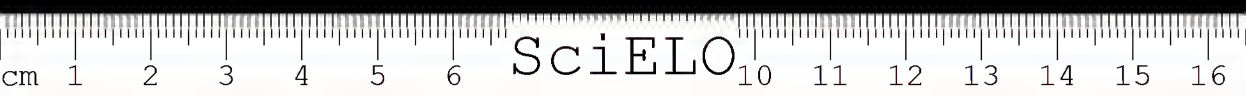
O estudo estatístico das diferenças sexuais da folidose em diferentes amostras de *B. alternata*, levou a conclusões definidas quanto à magnitude dessas diferênças e à sua possível importância no problema da especiação.

ABSTRACT

The statistical study of the sexual differences in the pholidosis in various samples of *Bothrops alternata* D. & B., 1854 led to definite conclusions about the importance of these differences and their possible importance in the problem of speciation.

BIBLIOGRAFIA

Amaral, A. do (1934). Estudos sôbre ofídios neotrópicos. XXXI. Sôbre a espécie *Bothrops alternata* D & B, 1854 (Crotalidae). Variações. Redescrição. *Mem. Inst. Butantan*, 8, 161-182.





★ Impresso na ★
EMPRESA GRAFICA DA
"REVISTA DOS TRIBUNAIS" LTDA.
★ São Paulo ★

Undoubtful protection could be recorded only against few M. L. D. (1 - 100) of microorganisms and the activity *in vivo* has been found to be greater for the 4-4'-diaminodiphenylsulfone than for the 4-nitro-4'-aminodiphenylsulfone derivatives.

Among the most active drugs is the acylic formyl derivative of 4-4'diaminodiphenylsulfone. The trichloracetyl derivative of the same series presumably interesting in studies on the chemotherapy of tuberculosis, did also exhibit an evident antimeningococcic value.

Pyocyanin proved ineffective, whereas penicillin, as already pointed out by other investigators, showed a remarkable antimeningococcic power.

Agradecemos ao Prof. Q. Mingoja e ao Dr. F. Berti, que prepararam as diferentes sulfonas experimentadas nêste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. *Buttle, G. A. H., Stephenson, D., Smith, S., Dewing, T. & Forster, G. E.* (1937). The treatment of streptococcal infections in mice with 4:4' diaminodiphenylsulfone. *Lancet*, 232, 1331-1334.
2. *Fourneau, J., Tréfouel, J., Nitti, F. & Bovet, D.* (1937). Chimiothérapie de l'infection pneumococcique par la di-(p-acétilaminophenyl)-sulfone (1399F). *C. R. Acad. Sci.*, 205, 299-300.
3. *Nitti, F., Bovet, D. & Hamon, V.* (1938). Le sort des aminophénylsulfones dans l'organisme et leur activité antimicrobienne. *C. R. Soc. Biol.*, 128, 26-28.
4. *Mingoja, Q.* (1943). Novas sulfonas quimioterapicamente ativas. *Arq. de biol.*, 27, 4-7.
5. *Biocca, E.* (1943). Quimioterapia sulfônica da toxoplasmose. *Arq. de biol.*, 27, 7-10.
6. *Miller, C. P. & Foster, A. Z.* (1944). Studies on the action of penicillin; therapeutic action of penicillin on experimental meningococcal infection in mice. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 56, 166-169.
7. *Bergmann, E., Haskelberg, L. & Bergmann, F.* (1941). Synthesis of lipophilic chemotherapeuticals. VI. Lipophilic substitutions in azo-dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 2245-2248.

(Recebido para publicação em maio de 1945).

